



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Análisis de los perfiles de la expresión de la vía de *NRF2* en una familia con cáncer renal hereditario relacionado con el Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario (HLRCC)**

**Carolina Arenas Valencia**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina , Departamento Morfología  
Maestría en Genética Humana  
Bogotá , Colombia  
2016

# **Análisis de los perfiles de la expresión de la vía de *NRF2* en una familia con cáncer renal hereditario relacionado con el Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario (HLRCC)**

**Carolina Arenas Valencia**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Genética Humana**

Directora:

MD., MSc. en Genética, MSc. en Bioética Clara Eugenia Arteaga Díaz

Línea de Investigación:

Cáncer hereditario

Grupo de Investigación:

Genética Clínica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Morfología

Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2016

*A mis padres Teresa y Eduardo por su incondicional apoyo en esta enorme travesía.*

*A Dios y a aquellos que se fueron, ya hace algún tiempo: Tina, Rosa y Niño.*

***“Los dos guerreros más poderosos con los que se puede contar son la paciencia y el tiempo”.***

***León Tolstoi***

# Agradecimientos

*A la Doctora Clara Eugenia Arteaga Díaz, por todas y cada una de sus enseñanzas, por la confianza que deposito en mí, por su incondicional apoyo en este magnifico viaje y por ser una luz en el camino de quienes tenemos la fortuna de conocerla. Muchísimas gracias.*

*Al Doctor Jorge Eduardo Caminos Pinzón, por toda la valiosísima ayuda que nos brindó durante el desarrollo de este trabajo.*

*Al Doctor Andrés Mauricio Pinzón Velasco, por toda su amable colaboración con el análisis de los datos, por su paciencia y por sus maravillosos aportes.*

*A la Doctora Liliana López Kleine, por su fantástica asesoría estadística y metodológica, sin la que este trabajo no seria lo que es.*

*Al Doctor Carlos Arturo Florido Caicedo, Director del Departamento de Morfología por toda su colaboración.*

*A mis Profesores, el Doctor Mauricio Rey Buitrago y el Doctor Edgar Garavito Rodríguez por toda su cooperación y por sus valiosas enseñanzas a lo largo de estos años.*

*Al Doctor Jean Paul Vernot Hernández y la Doctora Yolanda Cárdenas, quienes nos permitieron usar las instalaciones y demás, del Laboratorio de Equipos Comunes de la Universidad Nacional de Colombia.*

*A mi compañera y gran amiga Andrea Yimena Cardona Barreto, por todo el magnifico apoyo que me brindo para la consecución de este trabajo.*

*A mis compañeros y amigos de la Maestría, Ángela Muñoz, Diana Guerrero, Martha Rodríguez, Jhonny Vargas y Daniel Verbel por toda su ayuda, su animo y su buen humor.*

*A María Fernanda Garcés, por toda su asesoría en el laboratorio.*

*A toda mi familia, en especial a mis tíos Amilcar, Orlando, Mario e Inmaculada, por ser una fuente inagotable de aliento en los momentos más difíciles. Infinitas gracias.*

*A nuestros fabulosos pacientes, quienes fueron la motivación más sublime para realizar este trabajo y no desfallecer en el intento. Gracias, por no perder la fe en nosotros, por permitirnos conocer su historia y contarla al mundo. Esta tesis, es también un logro de Ustedes.*



# **Asesorías metodológicas**

## ***Doctora Liliana López Kleine***

PhD. Ciencias Biológicas. Institut National Agronomique Paris Grignon.

MSc Ecología, Evolución, Biometría- Université Claude Bernard Lyon 1.

Profesora asociada. Departamento de Estadística - Universidad Nacional de Colombia.

## ***Doctor Andrés Pinzón Velasco***

PhD. Ciencias Biológicas. Universidad De Los Andes

Profesor asociado. Bioinformática y Biología de sistemas.

Instituto de Genética Humana- Universidad Nacional de Colombia.

## Socialización del trabajo

- En calidad de Poster en el *Catorceavo Simposio Internacional de Cáncer Renal de la Asociación de Cáncer Renal de los Estados Unidos*. Miami, Florida. Noviembre 6 y 7 de 2015.
- En calidad de conferencia: Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario (HLRCC) breve revisión, en el marco del *Primer Simposio de Enfermedades Raras ACEMUNAL*. Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia. Abril 22 de 2016.
- En calidad de Poster en el *Segundo Seminario de Jóvenes Investigadores 2016 - Instituto de Genética Humana*. Universidad Nacional de Colombia. Mayo 2016

## Resumen

El Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario (HLRCC por sus siglas en inglés) es una enfermedad de predisposición a cáncer, rara de la cual desde su primer reporte, solo se han descrito un poco más de 200 familias alrededor del mundo [1]. Hasta donde se sabe ninguna de estas en Colombia, ni tampoco en Latinoamérica.

Se trata de una patología de herencia autosómica dominante, caracterizada por la aparición de leiomiomas cutáneos, uterinos y cáncer renal papilar tipo 2; este último, agresivo y de inicio temprano [1] [2].

Si bien se conoce desde hace más de una década, que el síndrome HLRCC, se produce por mutaciones de línea germinal en el gen *FH*, que codifica para la proteína fumarato hidratasa, implicada en uno de los pasos catalíticos del ciclo de Krebs [2]; los aspectos fisiopatológicos de cómo esta alteración genética se correlaciona con el desarrollo de cáncer en los afectados, aún no son del todo claros. No obstante, en 2011 Adam y colaboradores [3] a partir de estudios en modelos murinos, concluyen que el aumento de las concentraciones de fumarato, debido a la inactivación de la enzima fumarato hidratasa, conlleva una sobreexpresión del factor de transcripción *NRF2* (factor-erythroid 2-related factor 2 por sus siglas en inglés), el cual tendría un papel crucial en la transformación maligna de los tejidos de pacientes con la mutación en el gen *FH*.

Así las cosas, el objetivo de este trabajo consistió en caracterizar los perfiles de expresión de la vía *NRF2* en pacientes afectados con el cáncer renal hereditario y portadores de mutación en línea germinal de *FH*, pertenecientes a una familia con HLRCC. Se contó entonces, con la participación de 20 miembros de una familia colombiana que presentaba hallazgos clínicos compatibles con el Síndrome, y en quienes se adelantó una caracterización clínica y genética, por medio de la cual se identificaron 6 individuos que tienen una mutación en *FH* denominada c.1349\_1352delATGA, que nunca antes había sido reportada en la literatura, pero que

altera el funcionamiento normal de la proteína al truncarla. Los 6 sujetos, que incluyen al probando, corresponden a 2 mujeres y 4 hombres. Todas las mujeres tenían antecedente de leiomiomas uterinos, únicamente un hombre exhibía quistes renales y el probando era el único afectado con el cáncer renal papilar tipo 2. Ningún paciente presentaba leiomiomas cutáneos.

Luego de la caracterización clínica y genética, la siguiente fase del trabajo consistió en determinar las concentraciones de fumarato en orina así como los perfiles de expresión de *NRF2* en los pacientes. En este sentido, no se advirtió un aumento en el fumarato urinario en los pacientes, pero si se encontró que en las muestras de los individuos con la mutación en *FH*, puede existir una sobreexpresión la vía de *NRF2*, en relación al grupo de controles sanos no relacionados.

Esta investigación, constituye el primer trabajo hecho en Colombia y probablemente en Latinoamérica, sobre el Síndrome HLRCC. Se presenta una familia, con una mutación en *FH* no reportada previamente y se evidencian blancos directos de *NRF2* expresados a la alta en estos pacientes. La información aquí expuesta, puede ser un antecedente relevante para futuros trabajos sobre esta patología.

*Palabras clave: HLRCC, NRF2, FH, fumarato hidratasa, cáncer renal hereditario.*

## Abstract

Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome (HLRCC) is a rare disease and since the first report, it has been found in just over 200 families approximately, around the world. [1] Patients in Colombia or in Latin America have not been described, as far as we know.

It is a disease inherited in an autosomal dominant manner, characterized by the appearance of cutaneous and uterine leiomyomas, and an early-onset, aggressive form of type 2- papillary renal cell carcinoma [1] [2].

Although since more than a decade it's know that HLRCC syndrome it is caused by heterozygous germline mutations in the *FH* gene, which encodes the fumarate hydratase

enzyme that participates in one of the main catalytic steps of Krebs cycle; the pathophysiological aspects of how this genetic alteration is correlated with the development of cancer in affected patients, are unclear. Nevertheless, in 2011 Adam et al [3] from studies in murine models, concluded that the increasing concentrations fumarate, due to inactivation fumarate hydratase enzyme, leads to overexpression of the transcription factor *NRF2* (factor-erythroid 2-related factor 2), which would have a crucial role in the malignant transformation of tissues of patients with the mutation in the *FH* gene.

The aim of this work was to characterize the expression profiles of the *NRF2* pathway in patients with hereditary renal cell cancer and carriers of germline mutation in *FH*, belonging to a family with HLRCC. 20 members of a Colombian family that had clinical findings compatible with the syndrome participated. In all of them, we perform a clinical and genetic characterization and we identified six individuals who had a mutation in *FH* named as c.1349\_1352delATGA which had not been reported before, but have a high impact on normal protein function through protein truncation. The 6 subjects that included the proband, correspond to four men and two women. All women had history of uterine leiomyomas, only one men exhibited renal cysts and the proband was the only one with the type 2- papillary renal cell carcinoma. None of them presented cutaneous leiomyomas.

After clinical and genetic characterization, the next phase of the work was to determine the concentrations of fumarate in urine and expression profiles of *NRF2* in patients. An increase in urinary fumarate were not observed in patients but if it was found that in samples of individuals with *FH* mutation, could exist an overexpression of *NRF2* pathway in relation to the group of unrelated healthy control.

This research, is the first work done in Colombia and probably in Latin America, on HLRCC Syndrome. A family is presented with a mutation in *FH* not previously reported and direct targets of *NRF2* up regulated in these patients are evident. The information contained herein, may be a relevant precedent for future work on this pathology.

*Key words:* HLRCC, *NRF2*, *FH*, fumarate hydratase, hereditary renal cell cancer.

# Contenido

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMEN .....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>CONTENIDO .....</b>   | <b>XII</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>  | <b>XIV</b>  |
| <b>LISTA DE TABLAS .....</b>   | <b>XVI</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>                                   | <b>XVII</b> |
| <b>Introducción .....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>Planteamiento del problema .....</b>                              | <b>3</b>    |
| <b>Objetivos .....</b>   | <b>6</b>    |
| <b>Objetivo General .....</b>  | <b>6</b>    |
| <b>Objetivos específicos .....</b>                                   | <b>6</b>    |
| <b>Justificación .....</b>   | <b>7</b>    |
| <b>1. Marco teórico.....</b>   | <b>8</b>    |
| <b>1.1 Generalidades del Síndrome HLRCC .....</b>                    | <b>8</b>    |
| <b>1.2 Aspectos clínicos del Síndrome HLRCC .....</b>                | <b>8</b>    |
| 1.2.1 Leiomiomas cutáneos .....                                      | 8           |
| 1.2.2 Leiomiomas uterinos .....                                      | 9           |
| 1.2.3 Cáncer renal papilar tipo 2 .....                              | 10          |
| 1.2.4 Otras manifestaciones .....                                    | 11          |
| <b>1.3 Diagnóstico y seguimiento .....</b>                           | <b>11</b>   |
| <b>1.4 Tratamiento.....</b>  | <b>12</b>   |
| 1.4.1 Leiomiomas cutáneos .....                                      | 13          |
| 1.4.2 Leiomiomas uterinos .....                                      | 13          |
| 1.4.3 Cáncer renal papilar tipo 2 .....                              | 13          |
| <b>1.5 Aspectos genéticos y moleculares del Síndrome HLRCC .....</b> | <b>13</b>   |
| 1.5.1 Mutaciones en <i>FH</i> .....                                  | 13          |
| 1.5.2 Fisiopatología del Síndrome HLRCC .....                        | 15          |
| <b>1.6 El factor de transcripción <i>NRF2</i> .....</b>              | <b>18</b>   |
| 1.6.1 La vía de <i>NRF2</i> .....                                    | 19          |
| 1.6.2 El rol dual de <i>NRF2</i> .....                               | 21          |
| <b>1.7 <i>NRF2</i> como blanco terapéutico en cáncer .....</b>       | <b>23</b>   |
| 1.7.1 Moléculas pequeñas inhibidoras de <i>NRF2</i> .....            | 23          |
| 1.7.2 Moléculas que mejoran la degradación de <i>NRF2</i> .....      | 24          |
| <b>2. Metodología .....</b>  | <b>26</b>   |
| <b>2.1 Tipo de estudio y muestreo .....</b>                          | <b>26</b>   |
| <b>2.2 Pacientes .....</b>   | <b>26</b>   |
| <b>2.3 Criterios de inclusión y exclusión .....</b>                  | <b>27</b>   |
| <b>2.4 Primera etapa .....</b>                                       | <b>27</b>   |
| 2.4.1 Caracterización Clínica .....                                  | 27          |
| 2.4.2 Extracción de DNA .....  | 27          |
| 2.4.3 Análisis de mutación en <i>FH</i> .....                        | 28          |
| <b>2.5 Segunda etapa .....</b>                                       | <b>29</b>   |
| 2.5.1 Medición de concentraciones de fumarato en orina .....         | 29          |
| 2.5.2 Microarreglos de expresión de <i>NRF2</i> .....                | 31          |
| 2.5.3 Extracción de PBMCs .....                                      | 33          |
| 2.5.4 Análisis de microarreglos .....                                | 36          |
| 2.5.4.1 Análisis de datos de los microarreglos .....                 | 38          |
| 2.5.4.2 Expresión génica y pre-procesamiento de datos .....          | 38          |

|   |            |
|---|------------|
| 2.5.4.3 Detección de expresión génica entre casos y controles .....   | 38         |
| 2.5.5 Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados .....                                    | 39         |
| 2.5.6 Construcción de redes con los genes diferencialmente expresados .....                                 | 41         |
| 2.5.7 Identificación de blancos de <i>NRF2</i> en la lista de genes diferencialmente expresados .....       | 42         |
| 2.5.8 Validación por RT-PCR .....   | 47         |
| <b>2.6 Consideraciones éticas .....</b>   | <b>49</b>  |
| <b>3. Resultados .....</b>  | <b>51</b>  |
| 3.1 Primera etapa .....   | 51         |
| 3.1.1 Generalidades de la población de estudio .....  | 51         |
| 3.1.2 Análisis mutacional .....   | 52         |
| 3.1.3 Datos clínicos de los pacientes positivos para la mutación .....                                      | 53         |
| 3.2 Segunda etapa .....   | 55         |
| 3.2.1 Concentraciones de fumarato en orina .....  | 55         |
| 3.2.2 Análisis de microarreglos .....   | 56         |
| 2.5.4.1 Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados .....                                  | 58         |
| 2.5.4.1 Análisis de enriquecimiento de anotación génica .....   | 63         |
| 2.5.4.2 Red de interacción de genes diferencialmente expresados .....                                       | 71         |
| 2.5.4.3 Blancos de <i>NRF2</i> identificados en la lista de genes diferencialmente expresados .....         | 73         |
| 3.2.3 Validación por RT-PCR .....   | 76         |
| <b>4. Discusión .....</b>   | <b>78</b>  |
| <b>5. Conclusiones y recomendaciones .....</b>  | <b>89</b>  |
| <b>6. Bibliografía .....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>A. ANEXO: Carta de aceptación de manuscrito por revista indexada .....</b>                               | <b>97</b>  |
| <b>B. ANEXO: Consentimientos informados .....</b>   | <b>98</b>  |
| <b>C. ANEXO: Formato de Historia Clínica .....</b>  | <b>103</b> |
| <b>D. ANEXO: Datos de conteo y viabilidad celular PBMCs y especificaciones de las muestras de RNA. ....</b> | <b>106</b> |
| <b>E. ANEXO: Gráfica de normalización de los microarreglos .....</b>  | <b>107</b> |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Leiomiomas cutáneos ubicados en el dorso de un paciente con HLRCC .....   | 8  |
| Figura 2. Corte histológico de un leiomiomas cutáneo de un paciente con HLRCC .....   | 9  |
| Figura 3. Corte histológico de un leiomiomas uterino de una paciente con HLRCC .....  | 9  |
| Figura 4. Cáncer renal papilar tipo 2 en un paciente con HLRCC .....  | 10 |
| Figura 5. Visión general de todas las mutaciones patogénicas de línea germinal .....  | 15 |
| Figura 6. Efecto de la acumulación del fumarato y subsecuente inhibición de las enzimas PDH.....  | 16 |
| Figura 7. Reacción de adición de Michael y formación del 2SC .....  | 16 |
| Figura 8. Panorama general de todos los mecanismos moleculares que se han relacionado con la fisiopatología del cáncer en el síndrome HLRCC ..... | 18 |
| Figura 9. Representación de los dominios proteicos de NRF2 .....  | 18 |
| Figura 10. Esquema de la interacción de KEAP1 y NRF2.....   | 19 |
| Figura 11. Vía fisiológica de NRF2 .....  | 20 |
| Figura 12. Algunos de los genes corriente debajo de NRF2 .....  | 21 |
| Figura 13. Actividades duales de NRF2 en cáncer .....   | 22 |
| Figura 14. Mecanismos que conllevan a una activación constitutiva de NRF2 .....   | 23 |
| Figura 15. Modelo propuesto del efecto de la inhibición de ABL1 en tumores deficientes de <i>FH</i> .....   | 25 |
| Figura 16. Diagrama de flujo- Metodología primera etapa .....   | 29 |
| Figura 17. Esquema del sistema CG/EM .....  | 31 |
| Figura 18. Expresión de NRF2 en tejidos normales .....  | 33 |
| Figura 19. Vision general del procedimiento de separación de las células PBMCs .....  | 34 |
| Figura 20. Esquema de recuadros del hemocitometro. ....   | 35 |
| Figura 21. Diagrama general del análisis de microarreglos de un solo color .....  | 37 |
| Figura 22. Estructura de la base de datos construida para establecer el interactoma y reguloma de <i>NRF2</i> .....                               | 44 |
| Figura 23. Red de NRF2, a partir de únicamente de datos manualmente curados .....   | 45 |
| Figura 24. Visión general de la página de inicio de NRF2ome .....   | 46 |
| Figura 25. Ejemplo de la información proporcionada por NRF2ome .....  | 47 |
| Figura 26. Diagrama de flujo- Metodología segunda etapa. ....   | 48 |
| Figura 27. Árbol genealógico de la familia de estudio .....   | 51 |
| Figura 28. Distribución por género de los participantes .....   | 52 |
| Figura 29. Secuencia parcial del electroferograma del gen <i>FH</i> – exón 9 .....  | 52 |
| Figura 30. Distribución por género de los pacientes que resultaron positivos para el análisis de mutación .....                                   | 53 |
| Figura 31. Resultados ácidos orgánicos en orina por CG/CM .....   | 55 |
| Figura 32. Gráfica obtenida en SAM con un delta de 0.769 .....  | 56 |
| Figura 33. Mapa de calor y clúster jerárquico. ....   | 58 |
| Figura 34. Resultados Tabla de anotación funcional DAVID, genes a la alta. ....   | 64 |
| Figura 35. Resultados Tabla de anotación funcional DAVID, genes a la baja. ....   | 65 |
| Figura 36. Enriquecimiento modular genes expresados a la alta .....   | 66 |
| Figura 37. Gráfica de barras enriquecimiento modular.....   | 67 |
| Figura 38. Enriquecimiento modular genes expresados a la baja .....   | 68 |
| Figura 39. Gráfica de barras enriquecimiento modular.....   | 70 |
| Figura 40. Diagrama de Venn para enriquecimiento modular .....  | 71 |
| Figura 41. Red obtenida con GeneMANIA.org para genes expresados a la alta .....   | 72 |



---

|   |    |
|---|----|
| Figura 42. Red obtenida con GeneMANIA.org para genes expresados a la baja .....   | 72 |
| Figura 43. Representación grafica de los fold change obtenidos con la RT-PCR y los<br>microarreglos para cada gen .....                   | 77 |
| Figura 44. Representación grafica de la vía de <i>NRF2</i> a partir de los hallazgos de este<br>estudio y lo comentado por Xue et al..... | 88 |

## Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Datos clínicos relevantes pacientes masculinos.....                                | 53 |
| Tabla 2. Datos clínicos relevantes pacientes femeninos. ....                                | 54 |
| Tabla 3. Genes diferencialmente expresados a la alta obtenidos con estadístico SAM ..       | 57 |
| Tabla 4. Genes diferencialmente expresados a la baja obtenidos con estadístico SAM .        | 57 |
| Tabla 5. Anotación individual genes a la alta.....  | 59 |
| Tabla 6. Anotación individual genes a la baja.....  | 61 |
| Tabla 7. Blancos de <i>NRF2</i> encontrados en genes a la alta.....                         | 73 |
| Tabla 8. Blancos de <i>NRF2</i> encontrados en genes a la alta incluyendo <i>JDP2</i> ..... | 74 |
| Tabla 9. Blancos de <i>NRF2</i> encontrados en genes a la baja.....                         | 75 |
| Tabla 10. Resultados validación por RT-PCR .....  | 77 |

## Lista de abreviaturas

HLRCC: Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario  
*NRF2*: factor-erythroid 2-related factor 2  
RCC: carcinoma de células renales  
MCULs: síndrome leiomiomatosis cutánea y uterina múltiple  
*HIF1-α*: hypoxia-inducible factor 1- α  
PDH: prolyl-hydroxylases  
pVHL: Von Hippel-Lindau protein  
RMN: Resonancia Magnética Nuclear  
MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification  
VEGFA: vascular endothelial growth factor A  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
*GLUT1*: Glucose transporter 1  
*PDGF*: Platelet-derived growth factor  
*TGF-α*: Transforming growth factor alpha  
2SC: 2 succinil-cysteine  
KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1  
AMPK: AMP-activated protein kinase  
ACC: Acetyl-CoA carboxylase  
S6: Phospho-S6 Ribosomal Protein  
mTOR: mammalian Target of Rapamycin  
MAFK: musculo-aponeurotic fibrosarcoma  
ROS: Reactive oxygen species  
HO-1: Heme oxygenase-1  
ATRA: All-Trans-Retinoic Acid  
TAC: Tomografía Computarizada  
CG/EM: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas  
PBMCS: Células mononucleares de sangre periférica.  
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute.  
PM: Perfect Match  
MM: Miss Match  
SAM: Significance Analysis of Microarrays  
FDR: False Discovery Rate  
GO: Gene Ontology  
NCBI: National Center for Biotechnology Information  
HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee  
UniProtKB: UniProt Knowledgebase  
DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery  
Genecodis: Gene annotations co-occurrence discovery  
KEEG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
miRNA: micro RNA  
GeneMANIA: GeneMultiple Association Network Integration Algorithm  
GEO (Gene Expression Omnibus  
InterPro (Protein Analysis and classification  
ChIP-seq:chromatin immunoprecipitation (ChIP) with massively parallel sequencing  
RT-PCR: Real Time PCR  
*GAPDH*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
*JDP2*: Jun Dimerization Factor 2  
*PGAM5* (phosphoglycerate  
bZIP: basic zipper  
AP-1: Activation Protein

## Introducción

El cáncer, pese a los avances terapéuticos hechos en las últimas décadas, continua siendo una importante causa de morbilidad a nivel mundial. En Colombia, constituye un problema de salud pública [4] [5] y según los últimos datos entregados por el Ministerio de Salud en el año 2013, se estima que en el país anualmente 55.000 personas se diagnostican con algún tipo de cáncer y de estas 33.000 fallecen [4].

Si bien la gran mayoría de cánceres, son de tipo esporádico, los recientes avances en el campo de la genética, han permitido un aumento en el diagnóstico de pacientes con formas hereditarias de cáncer; las cuales se caracterizan porque hay la mutación de un gen en línea germinal, que predispone a los individuos para que presenten un tipo específico de tumor. Estas enfermedades, se caracterizan por tener una edad de inicio temprana, exhibir en la mayoría de casos, un modo de herencia autosómico dominante y ser de mal pronóstico; en parte por su alto potencial metastásico y por la falta de tratamientos realmente efectivos para estos pacientes [6].

En este orden de ideas, el Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario (HLRCC por sus siglas en inglés - OMIM 150800), es una enfermedad caracterizada por la presencia de leiomiomas cutáneos, lesiones papulares o nodulares eritematosas que aumentan de tamaño y número con la edad; leiomiomas uterinos, masas fibroides en el útero que se acompañan de dolor pélvico y sangrado menstrual irregular; y en un 10-16% de los casos, la presencia de un cáncer renal papilar tipo 2 [1] [2] [7] [8] [9] [10].

Esta patología, se produce por mutaciones en el gen *FH*, que codifica para la proteína fumarato hidratasa, la cual interviene en el ciclo de Krebs convirtiendo el fumarato en malato. Se cree que con la inactivación de esta enzima, el fumarato se acumula y se convierte en un oncometabolito [11], capaz de impedir la efectiva degradación de entre otros, el factor de transcripción *NRF2*, encargado de regular genes asociados con la supervivencia y proliferación celular, y que haría parte de toda una cascada de moléculas implicadas en la transformación tumoral en los afectados [1] [2] [12] [13] [14].

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo quiso explorar algunos de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la formación de tumores renales en los pacientes con HLRCC, a través de la caracterización de los perfiles de expresión de *NRF2* y la medición de las concentraciones de fumarato, en afectados con el cáncer renal y portadores de la mutación en *FH*; todos pertenecientes a una familia colombiana, en la que logró confirmarse la presencia de esta patología y en la que se identificó una mutación patogénica nunca antes mencionada en la literatura.

Dada la imposibilidad de tener acceso, a tejido renal del afectado y a que obtener este tipo de muestras en portadores sanos con fines investigativos, es algo desde todo punto de vista, éticamente incorrecto; los análisis de expresión y la medición de fumarato, se realizaron en muestras de sangre periférica y orina, respectivamente; las cuales son de fácil acceso y cuyo uso está avalado en condiciones similares, por otras publicaciones [15] [16] [17].

Los resultados aquí presentados pueden ser muy útiles, para mejorar la comprensión de la fisiopatología de esta enfermedad y podrían ayudar también a establecer posibles blancos terapéuticos, a partir de la tipificación concienzuda de los genes diferencialmente expresados de la vía *NRF2*, que fueron encontrados en los pacientes con HLRCC. No obstante, creemos que un abordaje similar al utilizado en esta investigación, pero que contase con una mayor cantidad de pacientes y con muestras de tejido renal, seguramente aportaría conclusiones mucho más ricas

Finalmente, esta investigación cobra relevancia al ser el primer trabajo hecho en Colombia y probablemente en Latinoamérica sobre el Síndrome de HLRCC, por lo que, puede mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad en la comunidad médica y científica de la región, donde este y otros cánceres hereditarios son subdiagnosticados.

## Planteamiento del problema

El carcinoma de células renales (RCC por sus siglas en inglés), constituye una neoplasia agresiva, que se estima representa entre el 2 al 3% de todos los tumores malignos, en países industrializados. [8] Solo en 2012, 338.000 nuevos casos se reportaron a nivel mundial y 143.000 personas fallecieron por esta causa [18].

Si bien existen diferentes tipos histológicos, acompañados de manifestaciones clínicas variables, la mayoría de tumores renales no generan síntomas durante los primeros estadios y el diagnóstico se realiza incidentalmente o cuando se ha producido metástasis [7].

El RCC puede ser esporádico, asociado a factores de riesgo como: el consumo de tabaco, la obesidad, la hipertensión arterial y la exposición a algunos productos químicos. También, en aproximadamente un 3% de los casos, puede identificarse una causa genética heredable [8].

Respecto al RCC hereditario, se trata de un grupo de trastornos en los que existe una mutación de línea germinal en un gen específico, y cuya presencia en el individuo, lo predispone para el desarrollo de tumores renales, y en algunas ocasiones para otras formas de cáncer. De los 10 síndromes de cáncer renal hereditario descritos, el más común sigue siendo la Enfermedad Von Hippel-Lindau (OMIM 193300); generada por alteraciones en el gen *VHL* [7] [9].

Por su parte, el Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario HLRCC, es una patología de herencia autosómica dominante, cuyos primeros reportes se dieron en la década del 50, pero que solo fue reconocida claramente como una entidad, hasta 1973 cuando se describieron dos familias con miembros afectados por leiomiomas cutáneos y uterinos, y se identificó en un individuo la presencia de cáncer renal. En ese momento, se le dio el nombre de síndrome de Reed y más tarde se le conocería también como síndrome leiomiomatosis cutánea y uterina múltiple (MCULs por sus siglas en inglés) [1].

Para el año 2001 Launonen et al., [19] diagnostican dos familias finlandesas con leiomiomas cutáneos y uterinos, asociados con una forma rara de cáncer renal, el papilar tipo 2; se establece entonces, la asociación entre estos 3 hallazgos clínicos en los afectados y se acuña el termino HLRCC [1].

Al año siguiente en 2002, se logra dilucidar que este síndrome se produce por mutaciones en el gen *FH*, que codifica para la proteína fumarato hidratasa, la cual se inactiva en los pacientes. [10] A partir de ese descubrimiento, se producen varios trabajos encaminados a mejorar la comprensión sobre la fisiopatología de la enfermedad y se propone que la transformación maligna de las células de los individuos, se debe a un aumento del fumarato y a una mayor expresión del factor de transcripción *HIF1-α* (hypoxia-inducible factor 1- alpha por sus siglas en inglés) [12] [20] [21] [22].

Esta hipótesis, que prevaleció durante aproximadamente una década, plantea que la acumulación de fumarato ayudaría a la estabilización del *HIF1-α* mediante la inhibición competitiva de las enzimas PDH (prolyl-hydroxylases por sus siglas en inglés), que en condiciones normales se encargan de hidroxilar al HIF1-α y así ayudar a que este sea reconocido por el complejo de la pVHL (Von Hippel-Lindau protein), una ubiquitin ligasa que marca selectivamente proteínas para su degradación. Cuando existen altas concentraciones de fumarato intracelular, se genera un estado pseudohipoxico, las PHD no funcionan adecuadamente y se altera la degradación del HIF1-α, que dentro de sus blancos tiene factores de crecimiento, promotores de angiogénesis y genes implicados con el transporte de glucosa, los cuales sobreactivados se asocian con cáncer [13] [20] [21] [22].

Sin embargo, luego se establecería que existen otras moléculas implicadas en la fisiopatología del síndrome. En 2011 Adam et al., [3] después de adelantar ensayos en ratones con *FH* mutado, proponen que la activación anómala del factor de transcripción *NRF2* podría ser la responsable de la formación de los quistes renales que se dan en los tejidos *FH* deficientes y que se cree son la lesión primaria que antecede al tumor papilar tipo 2.

Respecto a este factor de transcripción, del cual ya se conocían varias de sus funciones desde del año 2000, hay que decir que se caracteriza por tener un rol central en la protección de las células frente al estrés oxidativo y xenobiótico; activa genes que se han asociado tanto con mecanismos antitumorales como protumorales, y actualmente sobre sus vías metabólicas se adelantan numerosas investigaciones, especialmente en líneas celulares de cáncer de pulmón, seno, vejiga e hígado [23].

En el contexto de los tumores papilares tipo 2, son dos los trabajos que han vinculado la activación de *NRF2* con este tipo de cáncer; el primero en 2013 de Ooi y colaboradores [22] que exploró el comportamiento de *NRF2* en el cáncer renal papilar tipo 2 esporádico y el segundo realizado en el 2015 por la red de investigación del atlas genómico del cáncer de Estados Unidos [24] que corrobora la existencia de una sobreexpresión de *NRF2* en tejido de tumores renales papilares tipo 2, efectuando en estos también un análisis para mutaciones en *FH*, el cual fue positivo en 5 de 8 tumores. No obstante, los autores no aclaran cuántas mutaciones eran somáticas y cuántas de línea germinal –si es que estas fueron encontradas- y tampoco ahondan concienzudamente en la clínica de los pacientes con estas neoplasias, para determinar si tenían otros hallazgos que pudieran configurar un síndrome HLRCC; por ahora no se conocen otros estudios que hayan examinado detalladamente la vía de *NRF2* en pacientes con HLRCC .

Y es que en términos generales, el Síndrome HLRCC es un trastorno bastante raro del que no se cuentan con datos ni de incidencia ni prevalencia, y del que solo se han descrito algo más de 200 familias en América del Norte, Inglaterra, Finlandia, India y Japón; [1] [10] ninguna hasta donde conocemos en Colombia, donde los datos epidemiológicos de cáncer renal en general son muy escasos, y no se realiza una distinción entre los casos esporádicos y hereditarios [14] [25].

De manera que este trabajo, pretendió caracterizar los perfiles de expresión relacionados con *NRF2* en una familia con HLRCC, y de esta forma no solo convertirse en el primer estudio hecho sobre la enfermedad en Colombia, sino además en el primer estudio que analizara las alteraciones de la vía de *NRF2* en estos pacientes.



## Objetivos

### Objetivo general:

- Caracterizar los perfiles de expresión de la vía *NRF2* en pacientes afectados con el cáncer renal hereditario y portadores de mutación en línea germinal de *FH*, pertenecientes a una familia con HLRCC; en relación a un grupo de controles sanos no relacionado

### Objetivo específicos:

- Realizar una caracterización clínica y genética de los miembros de la familia con el Síndrome HLRCC.
- Determinar las concentraciones de fumarato en orina en pacientes con cáncer renal hereditario y los portadores de mutación en línea germinal de *FH*.
- Establecer los perfiles de expresión génica diferenciales de *NRF2* en pacientes con el cáncer renal hereditario, portadores de mutación en línea germinal de *FH* y controles sanos, mediante análisis de microarreglos.

## Justificación

El Síndrome HLRCC, es una patología poco frecuente y muy poco conocida en nuestro medio, donde por lo que sabemos, no se ha producido el primer reporte de la misma. Y es que ni siquiera en los países del primer mundo, donde existen centros especializados en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes, y se han reportado varias familias con la enfermedad, se tienen datos de su incidencia o prevalencia [1] [9] [10].

El hecho de que se presente con lesiones cutáneas en su mayoría asintomáticas, leiomiomas uterinos que son muy comunes en la población femenina general, y tumores renales en solo el 10-16% de los afectados; dificulta su diagnóstico por parte de los profesionales de la salud, que la mayoría de veces no asocian el hallazgo de alguno de estos síntomas con una enfermedad hereditaria y mucho menos con el HLRCC [1].

Por otro lado, el cáncer renal papilar tipo 2 que se presenta en estos pacientes, es bastante agresivo, de inicio antes de los 40 años, con una supervivencia promedio de 2-5 años y no responde adecuadamente a la quimioterapia. La mayoría de individuos no presenta síntomas durante las primeras etapas, y el diagnóstico se realiza incidentalmente o cuando se ya se ha producido metástasis [1] [2] [9] [10].

Ante el panorama actual, muchos autores hablan de un subdiagnóstico del HLRCC [1] y por ello resulta necesario, mejorar el conocimiento clínico y molecular del mismo, con el fin de brindar a los afectados, abordajes terapéuticos más eficaces.

Así las cosas, este trabajo representó una oportunidad única de aportar al conocimiento del HLRCC, a partir del estudio de una familia colombiana en la que logró confirmarse la presencia del síndrome y en la que también se determinaron los perfiles de expresión de la vía de *NRF2* y las concentraciones de fumarato en orina, en un intento por comprender mejor los aspectos fisiopatológicos que rodean a esta enfermedad. Esperamos, que los hallazgos aquí presentados también logren crear conciencia sobre la existencia de la enfermedad en nuestro país, donde los cánceres hereditarios no hacen parte ni de las políticas públicas o de las estadísticas.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Generalidades del Síndrome HLRCC

El Síndrome HLRCC es una enfermedad de predisposición a cáncer, de penetrancia casi completa, que se produce por mutaciones de línea germinal en el gen *FH*, las cuales se transmiten siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante [2].

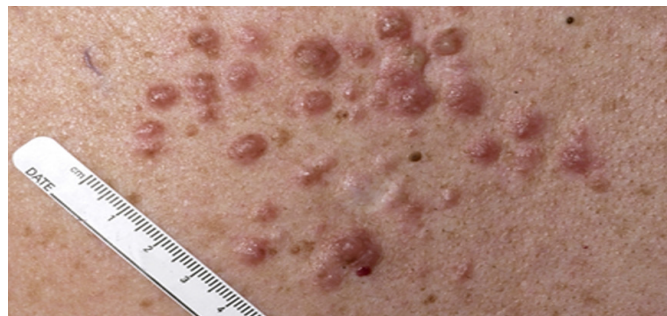
Descrita en la literatura por primera vez en 1973 por Reed et al., es una patología bastante rara de la que solo existen reportes, en aproximadamente 200 familias alrededor del mundo, y de la que no se tienen datos de incidencia o prevalencia [1].

## 1.2 Aspectos clínicos del síndrome HLRCC

A nivel clínico se caracteriza por la aparición de:

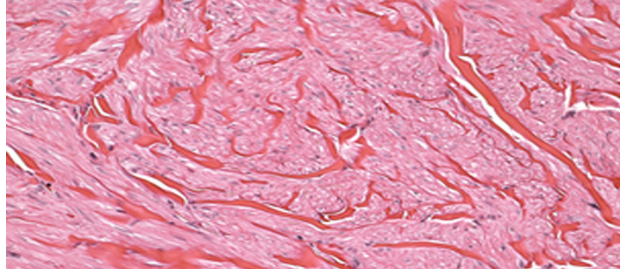
### 1.2.1 Leiomiomas cutáneos

Lesiones papulares o nodulares, eritematosas o de color café claro (Figura 1), que se distribuyen en el rostro, extremidades y tronco. Pueden apreciarse en más del 75% de los casos, con una edad promedio de aparición a los 25 años. Tienen un diámetro que varía entre 0,4 y 2,5 mm, aunque tienden a aumentar de tamaño y número con la edad. En ocasiones las lesiones pueden acompañarse de episodios de parestesias o dolor en la zona donde se encuentren [1] [2].



**Figura 1.** Leiomiomas cutáneos ubicados en el dorso de un paciente con HLRCC.  
Tomado de: Schmidt LS, Linehan WM. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2014;7:253-60.

Histológicamente, se caracterizan por ser grupos de células musculares lisas con un núcleo oval alargado (Figura 2) [2].

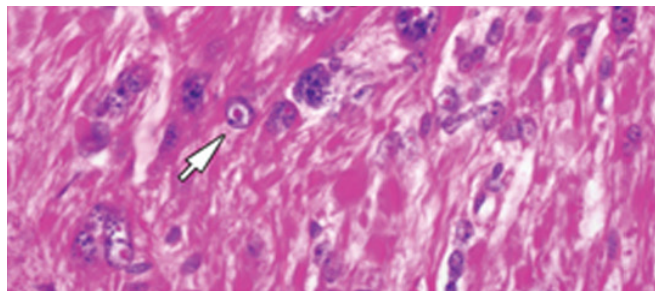


**Figura 2.** Corte histológico de un leiomiomas cutáneo de un paciente con HLRCC. Con tinción de hematoxilina-eosina se aprecian fibras de musculo liso con un núcleo alargado. Tomado de: Schmidt LS, Linehan WM. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2014;7:253-60.

### 1.2.2 Leiomiomas uterinos

Un 70% a 90% de las mujeres afectadas presentan estas masas fibroides, cuya edad de diagnóstico es entre los 18-52 años. Son causa frecuente de histerectomía temprana antes de los 40 años y se asocian con dolor pélvico y sangrados menstruales irregulares. En la mayoría de pacientes son múltiples y con un diámetro de 1.0-10 cm [9] [26].

A nivel histológico, se observan como un cúmulo de células con un núcleo único alargado o multinucleadas. En menos de 1% de los casos, los leiomiomas pueden malignizarse a leimiosarcomas uterinos, que poseen una histología atípica (Figura 3) [1] [2].



**Figura 3.** Corte histológico de un leiomiomas uterino de una paciente con HLRCC. Con tinción de hematoxilina-eosina se aprecian los núcleos prominentes. Tomado de: Schmidt LS, Linehan WM. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2014;7:253-60.

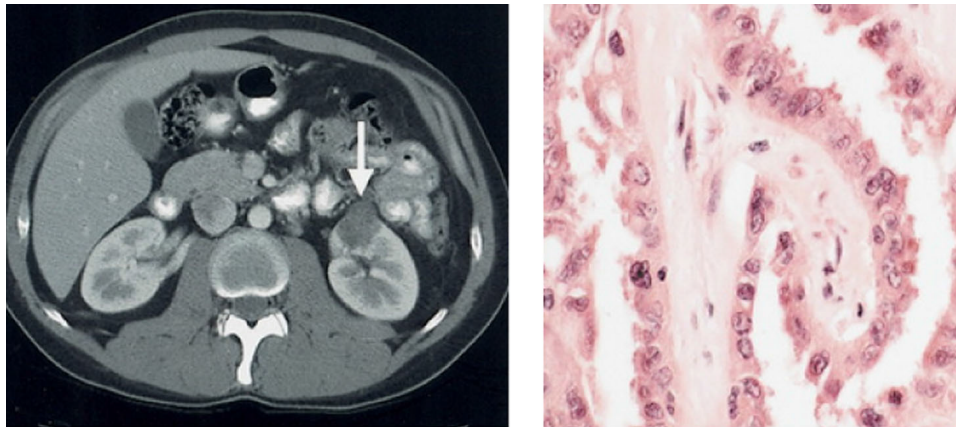
### 1.2.3 Cáncer renal papilar tipo 2

Ocurre en un 10-16% de los afectados, con una edad de aparición entre los 40-44 años. Se estima que puede aparecer en un 20% de las familias con el síndrome [6] [27].

Son tumores solitarios, agresivos, con un alto potencial metastásico y una sobrevida promedio de 5 años luego de su descubrimiento [6] [28] [27].

Generalmente, su diagnóstico es incidental y basado en el hallazgo de una masa renal (Figura 4 - panel izquierdo) en una Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [28] [27]. Sin embargo, estos tumores pueden acompañarse de síntomas como dolor de espalda, hematuria macroscópica e inclusive masa palpable; triada que puede observarse en un 6-10% de los pacientes con algún tipo de RCC [8].

En cuanto a su histología (Figura 4 - panel derecho), presentan citoplasmas abundantes, con núcleos prominentes que se encuentran rodeados por un halo claro [1] [2] [27].



**Figura 4.** Cáncer renal papilar tipo 2 en un paciente con HLRCC. De izquierda a derecha: Imagen de RMN abdominal donde se observa masa renal derecha en un paciente con HLRCC. Corte histológico del tumor papilar tipo 2 de este paciente el cual presenta los característicos núcleos prominentes rodeados de un halo perinuclear claro (Tinción hematoxilina-eosina). Tomado de: Menko FH, Maher ER, Schmidt LS, Middleton LA, Aittomäki K, Tomlinson I, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment. *Fam Cancer*. 2014;13(4):637-44.

#### **1.2.4 Otras manifestaciones**

Se han reportado también pacientes con: quistes renales [2] que pueden ser el primer estadio de carcinogénesis en el tejido renal [3], adenomas adrenales corticales, incidentalomas adrenales, cáncer de vejiga, seno, testículo, cistoadenomas de ovario y tumores de ducto colector renal. [27] [29]

#### **1.3 Diagnóstico y seguimiento**

Su diagnóstico parte de la sospecha clínica y se requiere una historia clínica completa, con un examen físico minucioso. [1] [2] [27]

Por el momento, no existe un consenso sobre cuáles deberían ser los criterios diagnósticos del HLRCC y existe aún gran controversia respecto al tema. Empero, en un artículo de 2014 Schmitd et al., [2] propone los siguientes criterios, que se basan en parte en aquellos presentados en el estudio holandés de 2011 de Smit y colaboradores: [1]

##### **Criterio mayor**

- ✓ Leiomiomas cutáneos múltiples, al menos uno con confirmación histopatológica.

##### **Criterios menores**

- ✓ Leiomioma cutáneo solitario e historia familiar de HLRCC.
- ✓ Cáncer renal papilar tipo 2 de inicio temprano, diagnosticado antes de los 40 años.
- ✓ Leiomiomas uterinos múltiples sintomáticos, de inicio antes de los 40 años.

##### **Diagnóstico definitivo**

- ✓ Análisis de mutación en línea germinal para *FH* positivo.

Pero lejos, de si se cumplen o no los anteriores criterios, todo paciente con clínica compatible de HLRCC, requiere estudio molecular confirmatorio, que inicia con una secuenciación completa del gen, con la que se pueden detectar más del 90% de los casos. Ante un resultado negativo y alta sospecha clínica, se debe implementar un

análisis de deleciones/duplicaciones mediante técnicas como MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification por sus siglas en inglés) [1] [2].

La relevancia de la confirmación molecular radica en que es esencial para brindar una adecuada asesoría genética a las familias. Además, permite la implementación de una serie de medidas de seguimiento y prevención [1] [2] [27], que según el HLRCC Alliance [30] deben incluir:

*Cuando el diagnóstico se dio antes de los 8 años de edad*

- ✓ Examen físico completo por parte de un pediatra, haciendo énfasis en la búsqueda de lesiones cutáneas características o masas abdominales.
- ✓ A partir de los 8 años, además del punto 1, realización de RMN de abdomen total o renal anual, para identificar la presencia de masas o quistes en el riñón. (\* Los cortes utilizados por el radiólogo para este examen deben ser muy delgados preferiblemente 1-3 mm)
- ✓ Referir a especialistas como dermatólogo, urólogo cuando sea necesario.

*Cuando el diagnóstico se dio después de los 8 años de edad*

- ✓ Examen físico completo por parte de un dermatólogo haciendo énfasis en la búsqueda de lesiones cutáneas características.
- ✓ Realización de RMN de abdomen total o renal anual, para identificar la presencia de masas o quistes en el riñón. (\* Los cortes utilizados por el radiólogo para este examen deben ser muy delgados preferiblemente 1-3 mm). Referir al urólogo cuando sea necesario.
- ✓ En el caso de las mujeres, a partir de los 18 años examen anual con ginecólogo para descartar la presencia de leiomiomas uterinos.

## **1.4 Tratamiento**

Los pacientes, requieren del manejo por parte de un equipo multidisciplinario, que incluya genetista, dermatólogo, ginecólogo, urólogo y oncólogo.

**1.4.1. Leiomiomas cutáneos:** Manejo sintomático del dolor y las parestesias asociadas. En casos que lo ameriten, remoción quirúrgica de lesiones únicas y ante formas múltiples, terapias con crioterapia, electrocoagulación o ablación laser [1] [2] [27].

**1.4.2 Leiomiomas uterinos:** Consulta anual con el servicio de ginecología, quienes evaluarán necesidad de miomectomía, anticonceptivos orales o histerectomía en casos graves [1] [2] [9] [26].

**1.4.3 Cáncer renal tipo 2:** Dada la gran agresividad de los tumores inclusive cuando son pequeños (menores a 1 cm) el tratamiento es siempre quirúrgico. Se realiza nefrectomía parcial o total con linfadenectomía retroperitoneal [27] seguida de quimioterapia con bevacizumab, un agente que inhibe a VEGFA (vascular endothelial growth factor A por sus siglas en inglés) y que se combina con erlotinib el cual bloquea la acción del EGFR (epidermal growth factor receptor por sus siglas en inglés) [2].

## **1.5 Aspectos genéticos y moleculares del HLRCC**

El Síndrome HLRCC es un trastorno producido por mutaciones de línea germinal en el gen *FH*, que se encuentra localizado en el cromosoma 1q42.3-43. Se trata de un gen que posee 10 exones y codifica para la proteína fumarato hidratasa, la cual posee 510 aminoácidos. [31] [32]

De esta proteína existen dos isótipos conocidos, uno citosólico del cual no se conoce con certeza su función, pero estaría implicado en el metabolismo de aminoácidos; y uno mitocondrial encargado de catalizar la conversión de fumarato en malato en el ciclo de Krebs y que se trataría de una forma altamente conservada durante la evolución [1].

### **1.5.1 Mutaciones en *FH***

Hasta el momento se han identificado más de 120 variantes patogénicas en el gen *FH*, la mayoría de las cuales son mutaciones de tipo missense; aunque pueden también encontrarse mutaciones frameshift, nonsense, inserciones/deleciones, del sitio de splicing y en menor medida deleciones génicas de gran tamaño (Figura 5) [1] [9] [10].

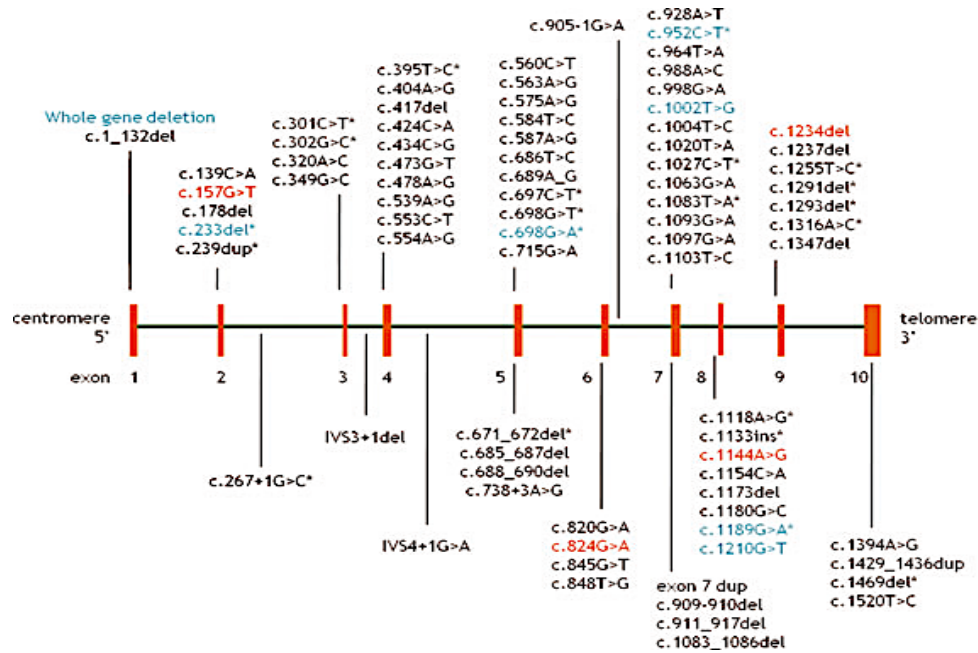


De acuerdo con varios reportes en la literatura, parecería existir un hot spot mutacional en Arg190, donde se han evidenciado mutaciones especialmente de tipo missense en cohortes de familias, procedentes de Norte América e Inglaterra. De todas las mutaciones reportadas en esta localización la más comúnmente observada es c.698G>A [1] [26] [33].

Es importante resaltar, que los pacientes con la mutación en línea germinal en *FH* -de acuerdo con la hipótesis de Knudson- requieren de un segundo hit que inactive el alelo wild type, para que se presentar una neoplasia. Esta condición hace que muchos califiquen al gen *FH* como un supresor tumoral. [2] [26] [33]

Se han identificado también mutaciones fundadoras: 905-1G>A, c.173G>C, c.1210G>T en familias judías, alemanas e inglesas, y holandesas, respectivamente [1] [9].

Por otro lado las siguientes mutaciones, se han observado con mayor frecuencia en familias afectadas por el cáncer renal: c.301C>T, c.302G>C, c.395T>C, c.698G>A, c.698G>T, c.697C>T, c.952C>T y c.233del (Figura 4). Sin embargo, los tumores renales, no siempre se desarrollan en aquellas familias con las anteriores mutaciones, y esto solo ilustra el hecho de que por el momento no se puede delinear una relación genotipo-fenotipo clara en esta patología [1] [26] [33].



**Figura 5.** Visión general de todas las mutaciones patogénicas de línea germinal. Hasta el año 2011. Aquellas con asterisco corresponden a las mutaciones detectadas preferentemente en familias afectadas por el cáncer renal.

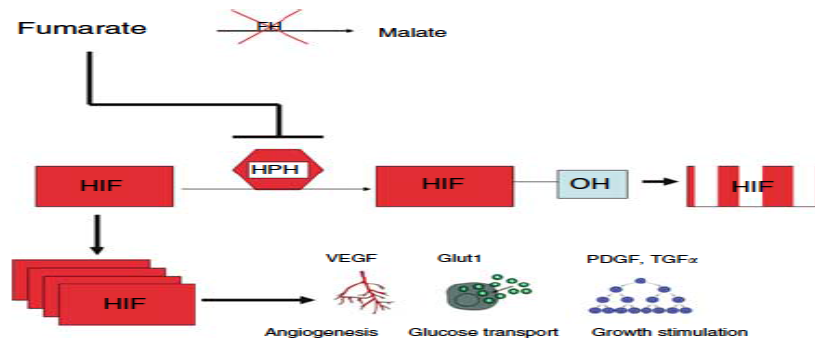
Tomado de: Smit DL, Mensenkamp AR, Badeloe S, Breuning MH, Simon MEH, van Spaendonck KY, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families referred for fumarate hydratase germline mutation analysis. Clin Genet. 2011;79(1):49-59.

### 1.5.2 Fisiopatología del Síndrome HLRCC

Las mutaciones de línea germinal en *FH*, implican la pérdida de actividad de la fumarato hidratasa, lo cual se traduce en una acumulación de fumarato intracelular [10] [11] [12] que a su vez, genera varios efectos patológicos (Figura 8):

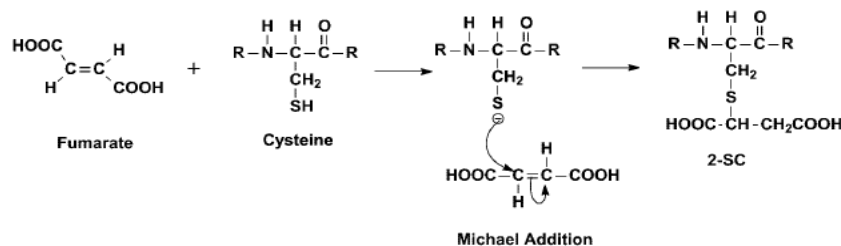
- Se altera el funcionamiento del ciclo de Krebs y se genera un estado de pseudohipoxia. Las células exhiben el efecto Warburg, que implica que las células de los tumores deficientes de *FH*, suplen sus requerimientos energéticos mediante glicolisis aeróbica [11] [12] [32].
- Se aumentan las concentraciones de HIF1- $\alpha$ : El fumarato es transportado desde la mitocondria al citosol y allí sus elevadas concentraciones inhiben competitivamente a las enzimas PHD. Estas últimas, normalmente hidroxilan los residuos de prolina del HIF1- $\alpha$ , [10] lo que permite que un complejo con actividad ubiquitin ligasa denominado pVHL, marque al HIF1- $\alpha$  para degradación por el

proteosoma [12]. La inhibición de las PHD implica que, el HIF1-a no se degrade correctamente y se genera una sobreactivación de sus genes blancos como *VEGF*, *GLUT1* (glucose transporter 1), *PDGF* (platelet-derived growth factor) y *TGF-a* (Transforming growth factor alpha), lo que conlleva a que se favorezcan procesos de proliferación celular, angiogénesis y glucólisis en los tejidos tumorales (Figura 6) [10] [12] .



**Figura 6.** Efecto de la acumulación del fumarato y subsecuente inhibición de las enzimas PDH o HPHs (HIF prolyl hydroxylases),  
Tomado de: Sudarshan S, Linehan WM, Neckers L. HIF and fumarate hydratase in renal cancer. British Journal of Cancer .2007;96: 403 – 407.

- Se da una succinización aberrante: La succinización es una reacción favorecida por la acumulación de fumarato. [3] [11] en la que este último interactúa con los grupos cisteína sulfhidrilo de las proteínas y mediante una reacción de adición de Michael, genera una modificación química estable llamada 2SC (2 succinil-cysteine), que altera la estructura e implica una inactivación funcional de la proteína blanco (Figura 7) [11].



**Figura 7.** Reacción de adición de Michael y formación del 2SC.  
Tomado de: Blatnik Mathew, et al. Inactivation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by Fumarate in Diabetes Formation of S-(2-Succinyl)Cysteine, a Novel Chemical Modification of Protein and Possible Biomarker of Mitochondrial Stress. Diabetes. 2008; 57:41–49

Lo anterior fue advertido en un inicio por Nogai et al., en 2007 [34] y Blatnik et al., en 2008 [35], quienes observaron que en tejido adiposo de ratones, sometido a altas concentraciones de glucosa, se daba un proceso de succinización mediado por exceso de fumarato.

Para el año 2011, Bardella y colaboradores [11] demostraron que era posible medir por inmunohistoquímica, el 2SC en los tumores renales papilares tipo 2. Por lo que proponen, que este producto de la succinización puede ser un biomarcador muy útil, a la hora de ayudar a determinar en qué pacientes con estos tumores, debería realizarse el análisis de mutación en *FH*, cuando otros hallazgos clínicos del HLRCC estén ausentes. Pese a lo demostrado en este trabajo, actualmente este método no es de uso clínico.

Por otro lado, la succinización implica la inactivación de una proteína, en tumores deficientes de *FH*, que se conoce como KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) que cumple un papel esencial en la degradación del factor de transcripción *NRF2*, como se discutirá más adelante [3].

- Hay una alteración en los niveles de AMPK (AMP-activated protein kinase): En condiciones fisiológicas, esta proteína actúa como un sensor energético, y cuando hay una deficiencia de ATP (Adenosina Trifosfato) AMPK se aumenta para incrementar el AMP. En el tejido tumoral de pacientes con HLRCC, en el que hay un rápido y constante consumo de ATP durante el crecimiento celular, se esperaría que la AMPK estuviese activada; no obstante, por razones desconocidas se encuentra más bien disminuida y relacionada con una mayor síntesis de ácidos grasos, crecimiento y proliferación celular, al generar la activación de entre otros, de las proteínas ACC (Acetyl-CoA carboxylase) y S6 (Phospho-S6 Ribosomal Protein), la última que es un efector de la vía de mTOR (mammalian Target of Rapamycin) [32].

Tomado de: Linehan WM, Rouault T a. Molecular pathways: Fumarate Hydratase-deficient kidney cancer - Targeting the warburg effect in cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(13):3345-52.

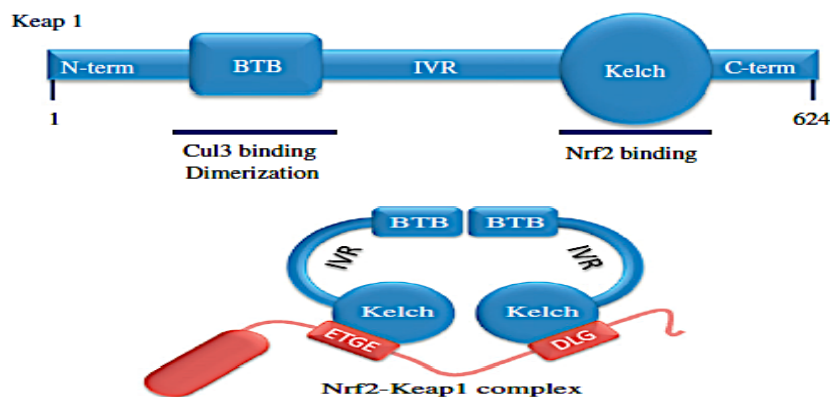
*NRF2*, se encarga de controlar la expresión de un grupo de genes antioxidantes, citoprotectores e implicados en el metabolismo de xenobióticos, los cuales tienen en su promotor un elemento ARE (Antioxidant Response Element) al que NRF2 se fija. [23] [37] [38]

### 1.6.1 Vía de *NRF2*

La vía *NRF2*, es muy relevante a la hora de proteger a las células frente al daño oxidativo, electrofílico o aquel producido por xenobióticos [37].

*En condiciones normales*, sin ningún tipo de estrés celular, NRF2 se encuentra en el citoplasma y bajo una constante degradación, mediada gracias a la estabilización que sufre por su unión con KEAP1; el cual funciona como un adaptador para que la proteína CUL3 (Cullin 3) -una ubiquitin ligasa 3 -marque a NRF2 para degradación por el proteosoma (Figura 10) [23] [39].

La interacción de NRF2 y KEAP1, es un proceso altamente regulado en el que el dominio Kelch de KEAP1 es el principalmente implicado [37] (Figura 9).

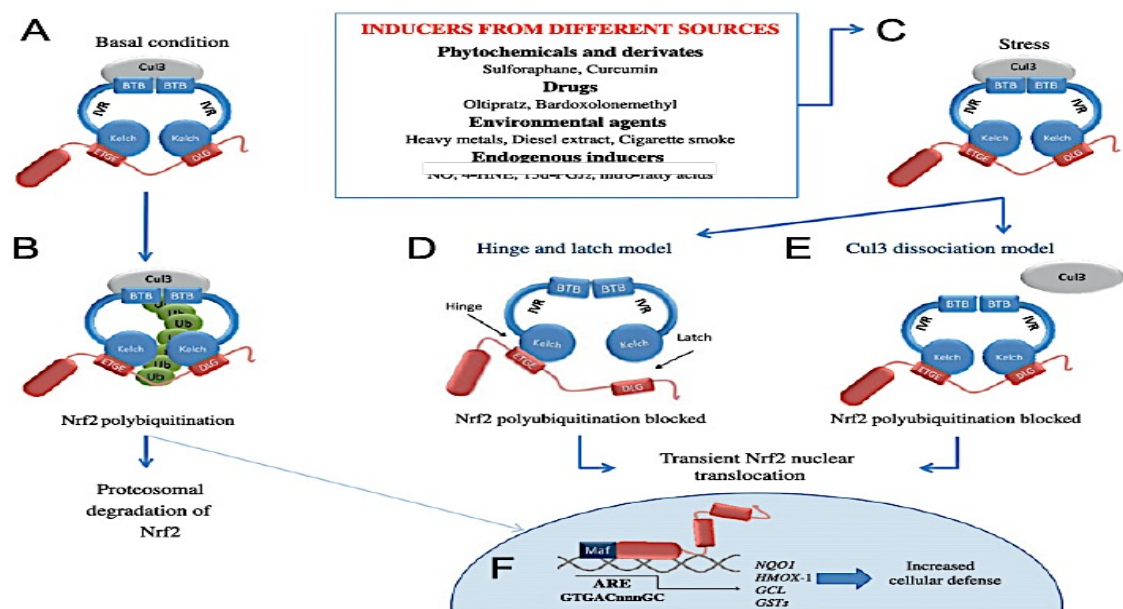


**Figura 10.** Esquema de la interacción de KEAP1 y NRF2. Panel superior: Dominios proteicos de KEAP1 cuyo gen está en 19p13.2. La proteína tiene 624 aminoácidos y cerca de su región amino terminal tiene el dominio BTB de unión a CUL3 y adyacente a la carboxilo terminal, presenta el dominio Kelch de unión a NRF2; estos dominios se encuentran separados por regiones IVR. Panel inferior: Representación de la interacción entre NRF2 y KEAP1.

Modificado de: Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. Elsevier; 2013;1(1):45-9.

En condiciones de estrés, el cual puede ser mediado por diferentes fuentes (Figura 11) NRF2 se disocia de KEAP1 y escapa de la degradación. Este desacoplamiento de KEAP1, puede darse de dos formas (Figura 11): 1. según el modelo bizagra-cerrojo (Figura 10) al existir estrés celular, KEAP1 sufre una modificación en uno de sus residuos de cisteína, con lo que su conformación estructural cambia y NRF2 puede disociarse. 2. En respuesta a ciertos electrófilos KEAP1 y CUL3 se separan, y ello conlleva a que NRF2 se libere de este complejo. [23] [37] [38] [39]

Al no ser degradado por el proteosoma, NRF2 es capaz de translocarse al núcleo, donde interactúa con las proteínas MAFKs, que permiten al factor unirse al elemento ARE del promotor de sus genes blanco que incluyen entre otros, relacionados con la síntesis del glutatión, vía de las pentosas, reparación del DNA y detoxificación (Figura 12) [23] [37] [38] [39] [40].



**Figura 11.** Vía fisiológica de NRF2.

Tomado de: Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. Elsevier; 2013;1(1):45-9.



| Function                                   | Symbol   | Name   |
|--|----------|--|
| Synthesis and conjugation of glutathione   | GCLC     | Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit   |
|  | GCLM     | Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit  |
|  | GSR      | Glutathione reductase  |
|  | GSTA4    | Glutathione S-transferase alpha 4  |
|  | GSTM2    | Glutathione S-transferase mu 2   |
|  | GSTM3    | Glutathione S-transferase mu 3   |
|  | MGST2    | Microsomal glutathione S-transferase 2   |
| Antioxidant                                | PRDX1    | Peroxisiredoxin 1  |
|  | SRXN1    | Sulfiredoxin 1   |
|  | TXN      | Thioredoxin  |
|  | TXNRD1   | Thioredoxin reductase 1  |
| Drug metabolizing enzymes and transporters | NQO1     | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1   |
|  | EPHX1    | Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)   |
|  | AOX1     | Aldehyde oxidase 1   |
|  | ABCB6    | ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 6                                      |
|  | ABCC1    | ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 1                                     |
|  | ABCC5    | ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 5                                     |
|  | SLC25A25 | Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25             |
|  | SLC44A3  | Solute carrier family 44, member 3   |
|  | SLC48A1  | Solute carrier family 48 (heme transporter), member 1                                      |
|  | SLC7A11  | Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11 |
| Metabolic enzymes                          | TKT      | Transketolase  |
|  | G6PD     | Glucose-6-phosphate dehydrogenase  |
|  | IDH1     | Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP <sup>+</sup> ), soluble                                   |
|  | ADO      | 2-Aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase  |
| Heme and iron metabolism                   | LPL      | Lipoprotein lipase   |
|  | HMOX1    | Heme oxygenase (decycling) 1   |
|  | BLVRB    | Biliverdin reductase B [flavin reductase (NADPH)]  |
|  | FECH     | Ferrochelatase   |
| Transcription factors                      | FTH1     | Ferritin, heavy polypeptide 1  |
|  | FTL      | Ferritin, light polypeptide  |
|  | AHR      | Aryl hydrocarbon receptor  |
|  | CEBPA    | CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha  |
|  | HES1     | Hairy and enhancer of split 1  |
|  | MAFG     | v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)                           |
|  | MYC      | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)                                      |
|  | RXRA     | Retinoid X receptor, alpha   |
|  | YAF2     | YY1 associated factor 2  |

**Figura 12.** Algunos de los genes corriente debajo de NRF2.

Tomado de: Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. Trends Pharmacol Sci. Elsevier Ltd; 2013;34(6):340-6.

### 1.6.2 Rol dual de *NRF2*

A *NRF2*, se le han atribuido *acciones antitumorales*, ya que es capaz de inducir vías para proteger a la célula de la citotoxicidad derivada de ROS (reactive oxygen species), estrés electrófilico, radiación, drogas y toxinas. [32] [39] [38] [41] Y *acciones protumorales*, que se relacionan con que la sobreexpresión de *NRF2* y algunos de sus genes corriente abajo, pueden mediar en procesos de:

- Supervivencia celular: Se inhibe la apoptosis mediada por *p53* [13] [32] [41], hay activación de Bcl-2 y Bcl-XL [41] [42] , se inducen sistemas de reparación de daños del DNA [43].
- Crecimiento celular: Se promueve por activación del eje EGFR-MEK1/2-ERK, las vías el PI3K/Akt y mTOR [32] [41] [44] [45].
- Metástasis: se aumentan los procesos de angiogénesis por medio de la acción de

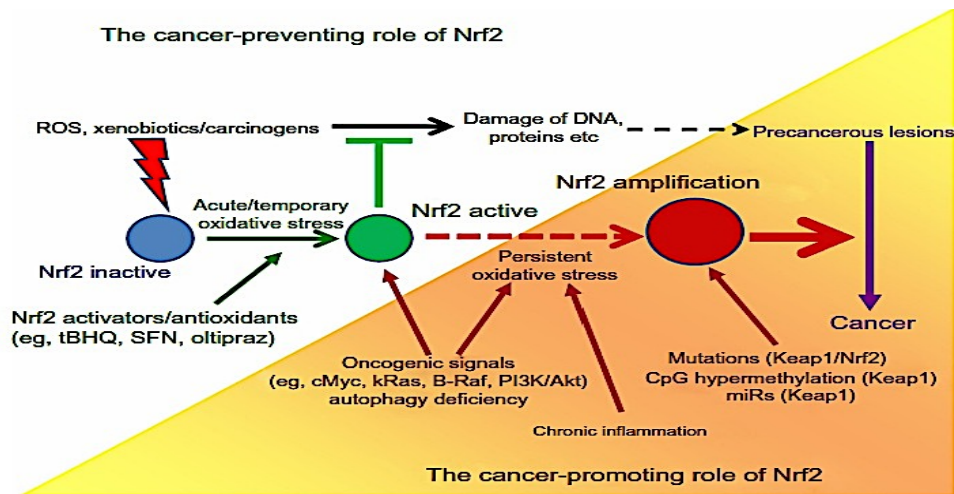


HO-1 (Heme oxigenase-1) uno de los principales blancos de NRF2. [41]

- Quimioresistencia de los tejidos tumorales [41] [46], por un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de bombas de eflujo de medicamentos dependientes de ATP [44] [47]. Así mismo, se ha advertido una disminución de la apoptosis y la autofagia mediada por quimioterapéuticos a través de la activación de HO-1, fenómeno observado específicamente en células de cáncer renal [48].

Dentro de los medicamentos objeto de resistencia mediada por *NRF2* podemos encontrar tres principales: etopósido, cisplatino y 5-fluorouracilo usados en el manejo de cáncer de vejiga y otras neoplasias [40].

*NRF2* entonces, puede decirse que tiene un rol dual en la célula. Su actividad basal controlada promueve la homeostasis celular y previene la malignización de los tejidos, al -entre otros- prevenir el daño en el DNA y activar una ruta aguda y temporal de respuesta al estrés celular. Sin embargo, ante señales oncogénicas, estrés persistente, inflamación crónica o mutaciones en alguno de sus reguladores -por ejemplo KEAP1- se da una amplificación de su señal y se facilita la supervivencia celular, lo que conlleva finalmente a la transformación maligna de los tejidos (Figura 13) [37] [47] [36] [49] [50].



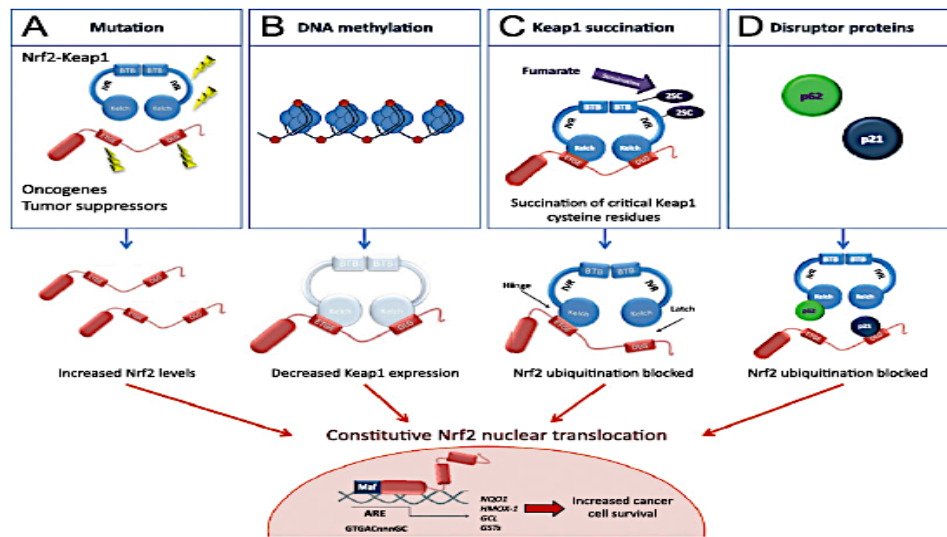
**Figura 13.** Actividades duales de NRF2 en cáncer.

Tomado de: Geismann C, Arlt A, Sebens S, Schäfer H. Cytoprotection «gone astray»: Nrf2 and its role in cancer. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1497-518.

Así, que es la sobreactivación de *NRF2* la que tendría un efecto deletéreo en las células.

Dicha sobreactivación, puede estar dada como en el caso del síndrome HLRCC por la succinización y subsecuente inactivación de KEAP1, fruto de la acumulación de fumarato, como fue demostrado por Adam et al., [3].

En cánceres esporádicos (pulmón, hígado, vejiga, seno, próstata, esófago, colon y en la forma esporádica del papilar tipo 2 de riñón) [22] [51] [21] son otros los mecanismos implicados (Figura 14): mutaciones somáticas en KEAP1, CUL3 o inclusive NRF2 [22] [40]; metilación del DNA de KEAP1 y la presencia de proteínas que logren impedir la unión de NRF2 y KEAP1, como son p62 y p21 [37].



**Figura 14.** Mecanismos que conllevan a una activación constitutiva de NRF2.

Tomado de: Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. Elsevier; 2013;1(1):45-9.

## 1.7 NRF2 como un blanco terapéutico en cáncer

En los últimos años, la vía NRF2 se ha convertido en una atractiva y potencial fuente de blancos terapéuticos en diversos tipos de cáncer. Se mencionan algunos de los abordajes más innovadores:

### 1.7.1 Moléculas pequeñas inhibidoras de NRF2

**Agonistas del receptor de ácido retinoico (RAR por sus siglas en inglés):** Los efectos de los retinoides en la célula se coordinan por intermedio de los receptores de

ácido retinoico alfa, beta o gamma, que al igual que los receptores retinoicos X (RXR por sus siglas en inglés) se encuentran en el núcleo. [40] [52] En 2007 Wang et al., demuestran que los agonistas del RAR alfa, como por ejemplo ATRA (All-Trans-Retinoic Acid), promueven una mayor interacción entre *NRF2* y este receptor a nivel nuclear, lo que previene la unión del factor de transcripción al elemento ARE de sus genes blanco, por lo que la vía se inhibe. [52]

**Brusatol:** Se trata de un compuesto derivado de la planta *Brucea javanica*, originaria del sudeste asiático y ampliamente usada por sus propiedades anticancerígenas en China. Su uso como inhibidor de *NRF2*, fue inicialmente notado por Ren y colaboradores [53], que en células cancerígenas de pulmón A549 observaron que el tratamiento con brusatol era capaz de reducir los niveles proteicos de NRF2 y disminuir la expresión de sus genes corriente abajo, todo al generar una mayor ubiquitinación y degradación del factor de transcripción en el citoplasma. Estos autores, también encontraron que el brusatol era capaz de sensibilizar las células A549 frente a cisplatino. En 2015, Olayanju et al., confirmaron los anteriores hallazgos, esta vez en células cancerígenas de hígado, concluyendo que el efecto del agente es transitorio y seguramente postraducciona [54].

**Luteolina:** Es un flavonoide contenido en plantas y vegetales, y se le han atribuido efectos antiinflamatorios y antioxidantes [55] [56]. Tang et al., [55] en 2011 demostraron que la luteolina era un potente inhibidor de *NRF2*, al disminuir los niveles de mRNA y proteína de este factor en células A549. Más tarde, Chian et al., [56] –también en células A549– lograron identificar que la luteolina, podía disminuir el crecimiento tumoral in vivo y aumentar el efecto del cisplatino.

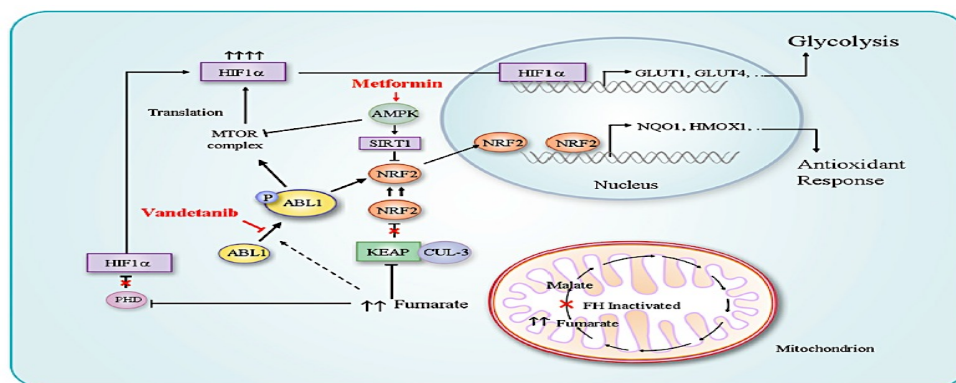
### 1.7.2 Moléculas que mejoran la degradación de *NRF2*

**USP15 (Ubiquitin-specific protease- 15):** Es una enzima deubiquitante que se expresa ubicuamente en todas las células y posee una estructura de dedos de zinc que le permite catalizar el desacoplamiento de las cadenas de poliubiquitina. [45] USP15 cuando se une a KEAP1, retira su marcaje de ubiquitina e impide su degradación por el proteosoma, además –como quedó claro en el estudio de Villeneuve et al., – esta enzima estabiliza a KEAP1 y mejora su interacción con CUL3, lo que conlleva a una mayor degradación de *NRF2* [57].

## Bloqueo de *NRF2* con *ABL1* en HLRCC

Mención especial merecen los hallazgos de la investigación de Sourbier y colaboradores [58], quienes en líneas celulares de tumores renales deficientes en *FH* de pacientes con HLRCC, concluyeron que el bloqueo de *ABL1* podía disminuir el crecimiento y la invasión tumoral.

*ABL1* hace parte de la familia de las ABL kinasas, que controlan rutas de transducción de señales relacionadas con la remodelación del citoesqueleto de actina, movilidad y adhesión celular, endocitosis y autofagia, así como daño en el DNA y apoptosis. En tejidos cancerosos, la actividad de *ABL1* se ve ligada a fenotipos de invasión tumoral [59]. En su trabajo de 2015, Sourbier y colaboradores [58], (Figura 15) observaron que en el cáncer renal papilar tipo 2 de pacientes con HLRCC, *ABL1* se encuentra indirectamente activado por las altas concentraciones de fumarato y el aumento de ROS, y que en estas mismas células, *ABL1* sobreactivado promueve: la glicolisis aeróbica y la localización nuclear de *NRF2*, que se activaría para contrarrestar el estrés oxidativo existente. Todos estos procesos, pudieron revertirse con el uso del inhibidor de receptores tirosin kinasa, vandetanib, que sería un fármaco prometedor en el tratamiento del cáncer en afectados por el Síndrome HLRCC.



**Figura 15.** Modelo propuesto del efecto de la inhibición de ABL1 en tumores deficientes de *FH*. Se Contrarresta la glicólisis aeróbica y la respuesta al estrés oxidativo mediada por la sobreactivación de NRF2. Los autores también proponen el tratamiento con metformina es un activador de AMPK.

Tomado de: Sourbier C, Ricketts CJ, Matsumoto S, Crooks DR, Liao P-J, Mannes PZ, et al. Targeting ABL1-Mediated Oxidative Stress Adaptation in Fumarate Hydratase-Deficient Cancer. Cancer Cell. Elsevier Inc.; 2014;26(6):840-50.

## 2. Metodología

### 2.1 Tipo de estudio y muestreo

Se trató de un estudio descriptivo y analítico, en el que el muestreo fue a conveniencia. Como se detallara más adelante, se contó con la participación de 20 miembros de la familia en mención y de 3 controles sanos no relacionados.

### 2.2 Pacientes

A la consulta de genética médica del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, llega un hombre de 36 años con antecedente de nefrectomía parcial derecha a los 35 años. Al interrogatorio, negó la presencia de cualquier síntoma particular y refería que la masa en el riñón derecho fue advertida durante una Tomografía Computarizada (TAC) Abdominal de rutina. La posterior biopsia del tumor, confirmó que se trataba de un cáncer renal papilar tipo 2. La madre, falleció por este mismo tipo de cáncer a los 58 años y otros familiares por línea materna en primer, segundo y tercer grado también murieron por esta causa. (Figura 27) En cuanto al examen físico, este no reveló nada llamativo y no se encontraron leiomiomas cutáneos.

Se evaluó como primera posibilidad diagnóstica en el probando, un Síndrome HLRCC, y se solicitó un análisis de mutaciones en línea germinal para *FH*, el cual fue realizado en un laboratorio internacional certificado. Este análisis, demostró la presencia de una delección heterocigota en el gen, a nivel del exón 9, denominada de acuerdo a las guías del Human Variation Society como c.1349\_1352delATGA (Gen *FH* número de acceso: NM\_000143.3), que nunca antes había sido reportada en la literatura (Reporte hecho en 2015 a revista indexada, actualmente en revisión, ver Anexo A), pero que comprometía la longitud la proteína, al truncarla y por lo tanto se consideró patogénica. Esta mutación tipo frameshift, a nivel de la proteína se nombra como *p.Asn450SerfsX3* (esto último, contando desde el primer ATG de la proteína no procesada, que tiene 510 aminoácidos) e implica un acortamiento en 59 aminoácidos.

Luego de realizar la respectiva asesoría genética al probando, se inició el acercamiento e incorporación de otros miembros de la familia que estuviesen interesados en participar en esta investigación.

### **2.3 Criterios de Inclusión y exclusión**

Miembros de la familia que expresaran su deseo de hacer parte de este trabajo de investigación y firmaran el respectivo consentimiento informado (Anexo B), y en el caso de los menores de edad, un asentimiento informado adicional (Anexo B).

### **2.4 Primera Etapa**

#### **2.4.1 Caracterización clínica**

Para la valoración clínica de los sujetos, se diseñó previamente, un formato de recolección de datos, dirigido a detectar la presencia de las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad y documentar los antecedentes personales y familiares de los individuos, junto con información sobre resultados de exámenes médicos relevantes. Dicho formato, se puede consultar en el apartado de Anexos de este manuscrito (Anexo C). El examen físico también fue detallado. Los anteriores abordajes fueron realizados por parte de la investigadora- que es médico cirujano- y contó con la estrecha colaboración y supervisión la directora de este proyecto, que es médica genetista.

Posteriormente, a todos los sujetos se les tomó una muestra de 8 ml de sangre, mediante punción en vena periférica, utilizando tubos al vacío vacutainer con EDTA, que fueron mantenidos refrigerados a una temperatura de 4 °C. Este procedimiento que fue ejecutado por un enfermero.

#### **2.4.2 Extracción del DNA**

El DNA se extrajo de las muestras de sangre periférica, usando el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit de Qiagen, siguiendo todas las especificaciones del protocolo del fabricante, que incluían la necesidad de usar un volumen inicial de sangre de 200 µl.

La cuantificación y determinación de pureza del ADN, se realizó en el equipo NanoDrop, de acuerdo a las instrucciones del manual de uso, que se encuentra en el Laboratorio de Equipos Comunes de la Universidad Nacional de Colombia.

### 2.4.3 Análisis de mutación en *FH*

#### Diseño de primers y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Teniendo ya una mutación considerada patogénica identificada en el probando, denominada c.1349\_1352delATGA, se decidió buscar esta misma, en los demás miembros de la familia en riesgo de portarla. Se diseñaron primers específicos para flanquear la región de la mutación, utilizando los programas bioinformáticos libres: Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), IDT-PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/primerquest/home/index>) y Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Se obtuvieron las siguientes secuencias de primers, los cuales se sintetizaron por intermedio de Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

| Exón      | Secuencia 5-3            | Tamaño | Amplificado | Temperatura melting | %GC   |
|-----------|--------------------------|--------|-------------|---------------------|-------|
| 9         |                          |        |             |                     |       |
| <b>F1</b> | GGGATGCTTCAGTTCCCTTAC    | 22     | 450 pb      | 57.30 °C            | 45.45 |
| <b>R1</b> | CCCACTGAAGGTCTTACAAATAAC | 24     |             | 57.50 °C            | 41.67 |

Para realizar la PCR, se utilizó el kit de PCR master mix (2X) de Thermo Scientific y se siguieron todas las instrucciones del inserto.

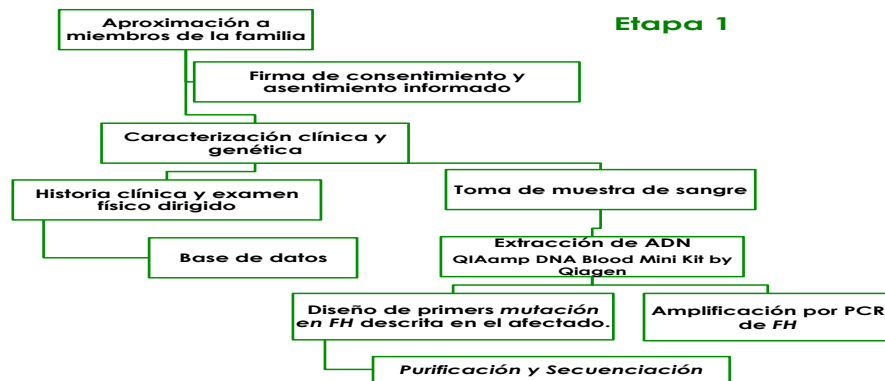
El programa del termociclador usado, luego de las respectivas estandarizaciones, fue el siguiente:

| Paso                        | Temperatura ( °C ) | Tiempo         | Número de ciclo |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| <b>Denaturación inicial</b> | 94 °C              | 3 minutos      | 1               |
| <b>Denaturación</b>         | 94 °C              | 45 segundos    | 33              |
| <b>Anillamiento</b>         | 60 °C              | 30 segundos    |                 |
| <b>Extensión</b>            | 72 °C              | 1 min y 30 seg |                 |
| <b>Extensión final</b>      | 72 °C              | 10 minutos     | 1               |
| <b>Conservación</b>         | 8 °C               | x $\infty$     |                 |

Con el fin de verificar la amplificación de los productos de PCR deseados, así como la concentración e integridad del DNA, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los fragmentos amplificados, se enviaron para purificación y secuenciación al laboratorio de MacroGen Inc. (Seúl, Corea).

Al finalizar esta primera parte, se logró clasificar a los sujetos en afectados (aquellos con manifestaciones clínicas y estudio de mutación positivo) y en portadores (aquellos asintomáticos y con estudio de mutación positivo).



**Figura 16.** Diagrama de flujo- Metodología primera etapa

## 2.5 Segunda Etapa

Los procedimientos que se describen a continuación, se realizaron en aquellos miembros de la familia que se identificaron como afectados y portadores, que aceptaron continuar en el estudio - después de finalizada la primera parte de caracterización clínica y genética - y que además firmaron un nuevo consentimiento informado (Anexo B). Estos pacientes, a menos que se aclare lo contrario, se compararon con controles sanos no relacionados a los que se les exigió también firma de consentimiento informado.

### 2.5.1 Medición de concentraciones de fumarato en orina

Para determinar las concentraciones de fumarato en los pacientes, en un principio se propuso la realización de un ensayo colorimétrico. No obstante, con el fin de obtener



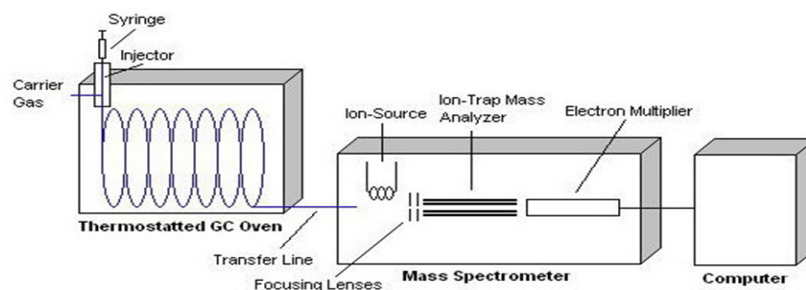
valores mucho más fiables y lograr evaluar de una mejor forma la actividad de la fumarato hidratasa; se decidió optar por la cuantificación de ácidos orgánicos en orina de cadena corta, dentro de los cuales se incluyen, no solo el ácido fumárico sino también el ácido málico, cuyas formas salina y no ionizada, son el fumarato y el malato respectivamente [60] [61].

Esta cuantificación, se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), la cual fue llevada a cabo por un Laboratorio externo especializado.

Brevemente, la CG/EM es un método analítico utilizado para separar e identificar sustancias individuales en mezclas complejas [62]. En el primer sistema, el cromatógrafo de gases, la muestra es volatilizada al ser expuesta a altas temperaturas, entre 200 y 300 grados centígrados [63]. Luego se mezcla con un gas inerte (fase móvil), que transporta la muestra a través de la columna cromatográfica [63]. Durante su paso por la columna, las moléculas del analito, dependiendo de su estructura química y propiedades físicas, son particionadas entre la fase móvil y la fase estacionaria, por un mecanismo de adsorción [62]. Respecto a la fase estacionaria, hay que decir que esta se encuentra contenida en la columna y puede ser sólida o estar en forma líquida, depositada e inmovilizada a su vez, en un sólido portador [62].

Cuando las moléculas ya han sido separadas, salen de la columna a diferentes tiempos y se dirigen al segundo sistema, el espectrómetro de masas, que en este caso actúa como un detector, en el que las moléculas se capturan, ionizan, aceleran, cuantifican e identifican [63]. En términos generales en el analizador del espectrómetro, se separan los iones de acuerdo al radio masa/carga, y es el patrón de fragmentación de cada sustancia, el que se compara con otros contenidos en una base de datos dentro del equipo; dicha comparación permite una identificación preliminar. La posterior identificación y cuantificación definitiva de la sustancia, dependerá del uso de un referente estándar. [63]

Con el acoplamiento de estos dos sistemas, puede lograrse entonces, una identificación casi inequívoca de los compuestos de una mezcla [63] (Figura 17).



**Figura 17.** Esquema del sistema de CG/EM. De izquierda a derecha, se observa el cromatógrafo de gases, el espectrómetro de masas y el computador acoplado.

Tomado: Gas Chromatography [Internet]. UC Davis. [ Citado 22 Enero 2016]. Disponible: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)

De manera que, se les indicó a los pacientes, que previo aseo genital, realizarán la toma de la primera orina de la mañana, en un frasco de plástico estéril debidamente rotulado, con el fin de obtener al menos 10-15 ml de orina. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente, en un término no mayor a dos horas después de la recolección, al Laboratorio en mención, donde se congelaron hasta su procesamiento. Este último, de acuerdo al reporte del Laboratorio, inició con la acidificación de un volumen de orina correspondiente a 0.25 mg de creatinina; para la extracción de los ácidos orgánicos se empleó acetato de etilo y solo después de la separación y evaporación de la fase solvente, el residuo seco se sometió a análisis por CG/EM. [64] [65]

## 2.5.2 Microarreglos de expresión de NRF2

Si bien, lo ideal hubiese sido realizar el estudio de los perfiles de expresión de *NRF2* en tejido renal, esto fue imposible para esta investigación, ya que ni siquiera del afectado se tenía la posibilidad de obtener tejido renal tumoral fresco, y en los portadores y controles sanos, esto implicaba un procedimiento altamente invasivo, con complicaciones innecesarias para los individuos, y por lo tanto éticamente incorrecto.

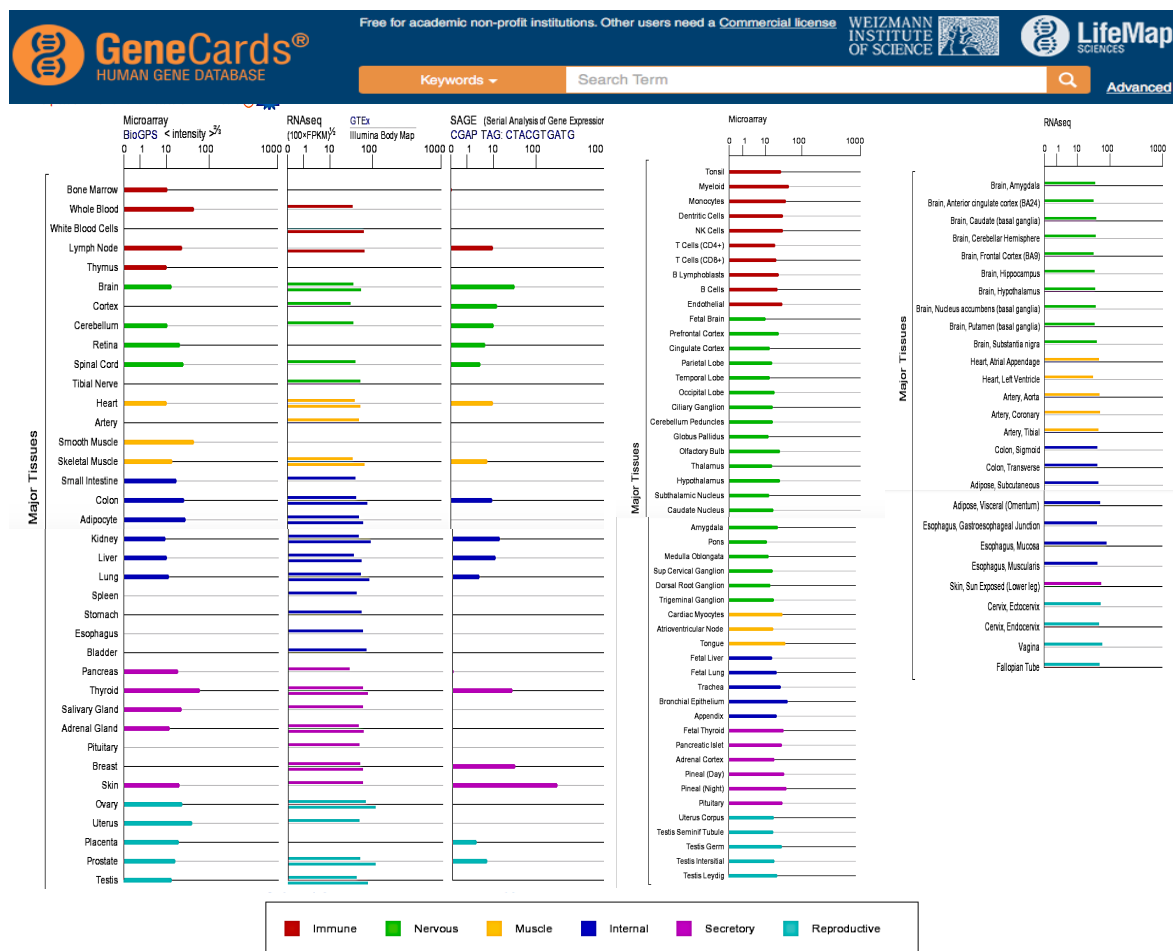
Así las cosas, se decidió efectuar una revisión bibliográfica sobre qué otras muestras podían ser útiles en los análisis de microarreglos, en el contexto de enfermedades neoplásicas en las que la obtención de tejido fuese compleja. En este orden de ideas, se encontraron trabajos de cáncer colorectal [15] [66] [67], de páncreas [16] [68], hígado [69], e inclusive renal [17]; en donde mediante el uso de células mononucleares de

sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés), los investigadores lograron obtener perfiles de expresión diferencial entre pacientes y controles. Por lo tanto, se consideró que esta metodología podía aplicarse a nuestro caso particular.

Las células mononucleares de sangre periférica, que incluyen monocitos, células T, B y natural killers, se han convertido en una atractiva opción para el estudio de neoplasias ya que pueden reflejar el estado inmune, inflamatorio y metabólico del individuo. Además la identificación de biomarcadores fiables en estas células, puede mejorar el diagnóstico temprano de múltiples cánceres, en los que la toma de biopsias resulta un procedimiento invasivo y peligroso. [67] [68]

Específicamente en relación a *NRF2*, es importante mencionar un estudio de 2013 de Reszka y colaboradores [70], que determinó la expresión diferencial de este factor de transcripción y de sus genes corriente abajo, en sangre periférica de pacientes con cáncer de vejiga y controles sanos; por lo que es un buen ejemplo de cómo este abordaje puede resultar útil a la hora de valorar la vía de este factor de transcripción.

Y es que, NRF2 tiene una buena expresión en PBMCs, ya que se ha correlacionado con procesos inmunes e inflamatorios, por lo que al realizar estudios de expresión en este tipo de células, se puede tener acceso al comportamiento de esta ruta biológica (Figura 18).



**Figura 18.** Expresión de NRF2 en tejidos normales. Detalle de los niveles de mRNA (RNA mensajero) en diferentes tejidos en ensayos de microarreglos, RNA seq y Análisis de expresión génica (SAGE por sus siglas en inglés).  
Modificado de: Genecards [Internet]. Rejovot. Instituto Weizmann de Ciencias; 1996. [actualizado 7 mayo 2015; citado 22 Enero 2016]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2&keywords=NFE2L2>

### 2.5.3 Extracción de PBMCs

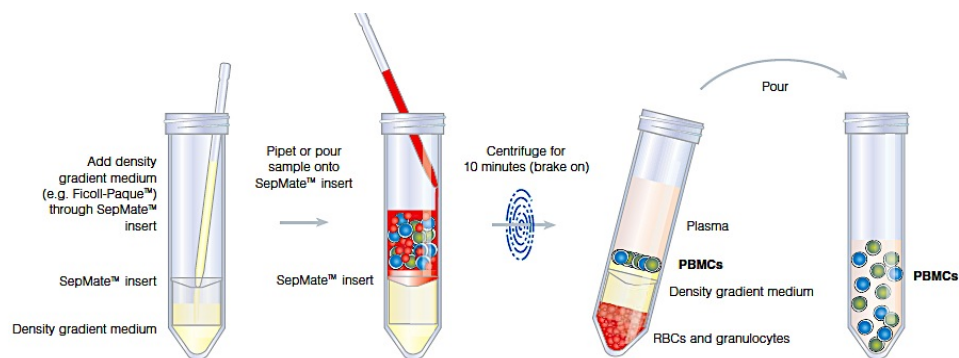
La extracción de estas células se hizo en pacientes y controles sanos no relacionados, usando los tubos especializados SepMate™ (stemcell technologies), que permiten el aislamiento de las células mononucleares de toda la sangre periférica de un individuo, mediante la aplicación de un gradiente de densidad.

Después de varias estandarizaciones, se modificaron algunos pasos, de los incluidos en el inserto técnico de los tubos; esto para mejorar la eficiencia del método. Se presenta un resumen del protocolo finalmente utilizado:

1. A cada individuo, se le tomaron 5 ml de sangre periférica en tubo de heparina, tapa verde. Con el fin de obtener los mejores resultados las muestras –que se mantuvieron todo el tiempo a temperatura ambiente - se procesaron en un intervalo no mayor a 40 minutos.
2. En cabina de flujo laminar, se añadió medio de gradiente de densidad Lymphoprep (Stem cell technologies) a cada tubo SepMate™ teniendo cuidado de pipetear solo por el centro del orificio de la membrana, que tiene cada tubo en su interior (Figura 19).

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, para 5 ml de sangre, el volumen de medio de gradiente de densidad que se adicionó fue de 3.5 ml.

3. A continuación, la muestra de sangre se diluyó en un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) pH 7.2, libre de magnesio y calcio.
4. Manteniendo el tubo vertical, la muestra diluida se pipeteo en el tubo SepMate™, intentando que esta no tuviese contacto con el orificio central de la membrana del tubo. (Figura 18)
5. Los tubos SepMate™, se centrifugaron con el freno puesto a 1200 gravedades por 10 minutos a temperatura ambiente. El resultado de esta centrifugación fueron 3 capas, siendo la segunda aquella donde se encontraban las PBMCs (Figura 19)
6. Se removió la capa superior de los tubos SepMate™ y con un movimiento rápido de inversión del tubo, se volcó el contenido restante (las PBMCs) en un nuevo tubo. (Figura 18)



**Figura 19.** Vision general del procedimiento de separacion de las celulas PBMCs. Con tubos SepMate™. Tomado de: SepMate procedure [Internet]. Stemcell Technologies Inc. [actualizado 2013; citado 22 Enero 2016]. Disponible:

<https://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/6/D/4/9/D/29251PIS.pdf?la=e>

7. Las PBMCs se lavaron con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI por sus siglas en inglés). Para un volumen de 4 ml de células, se usaron 4 ml del medio. Luego se centrifugo a 700 gravedades por 8 minutos, a temperatura ambiente, con el freno puesto.
8. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante.
9. El pellet de células, se resuspendió en 1ml de RPMI aplicando vortex.
10. Para el conteo y determinación de la viabilidad celular, se tomó una alícuota de 10 ul de la resuspensión. Brevemente: se mezclaron 10 ul de la suspensión celular con 10 ul de azul de tripan, permitiendo una incubación de 3 minutos. Esta mezcla se inyectó en la cámara de Neubauer, la cual se colocó en un microscopio de luz y se enfocaron las células con un aumento de 10 y 40 X. Se contaron las células viables -aquellas no teñidas con azul de tripan- en cada uno de los recuadros del hemocitometro (Figura 20); se determinó su total con la fórmula:  
$$\text{número de células viables} \times 2 \times 10.000 \times \text{el volumen total de la suspensión celular.}$$
  
En cuanto al porcentaje de viabilidad este esta basado en la fórmula:  
$$\text{número de células viables contadas} / \text{total de células contadas} \times 100.$$
11. Se centrifugó nuevamente a 700 gravedades por 8 minutos, a temperatura ambiente con el freno puesto.



**Figura 20.** Esquema de recuadros del hemocitometro. De izquierda a derecha. Diagrama de la cuadrícula que se aprecia al realizar el conteo celular con cámara de Neubauer y representación de cómo se ven las células en la cuadrícula.

Tomado de: Performing Cell Counts with a Hemacytometer. [Internet]. Human Immunology Portal. [citado 22 Enero 2016]. Disponible: <http://www.humanimmunologyportal.com/wp-content/uploads/pdf/singles/performing-cell-counts-with-a-hemacytometer.pdf>

12. Se decantó el sobrenadante, removiendo el exceso de líquido.
13. Las células se resuspendieron en 5 volúmenes de RNAlater (Life technologies) y se transfirieron a un tubo criovial de 1,5 ml previamente marcado. Los tubos se mantuvieron toda la noche a 4 grados centígrados. A la mañana siguiente, se

removió el sobrenadante de los tubos y estos se almacenaron a -80 grados centígrados.

#### **2.5.4 Análisis de microarreglos**

Las muestras de PBMC se enviaron en hielo seco, al Laboratorio de MacroGen Inc (Seúl, Corea) para extracción de RNA y realización de análisis de microarreglos con la plataforma Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0, la cual constituye un chip de expresión capaz de cubrir todo el genoma con más de 54.000 set de sondas y que provee información sobre aproximadamente 47.000 transcritos y sus variantes, incluyendo 38.500 genes bien caracterizados, dentro de los cuales esta *NRF2* y sus genes blanco [71].

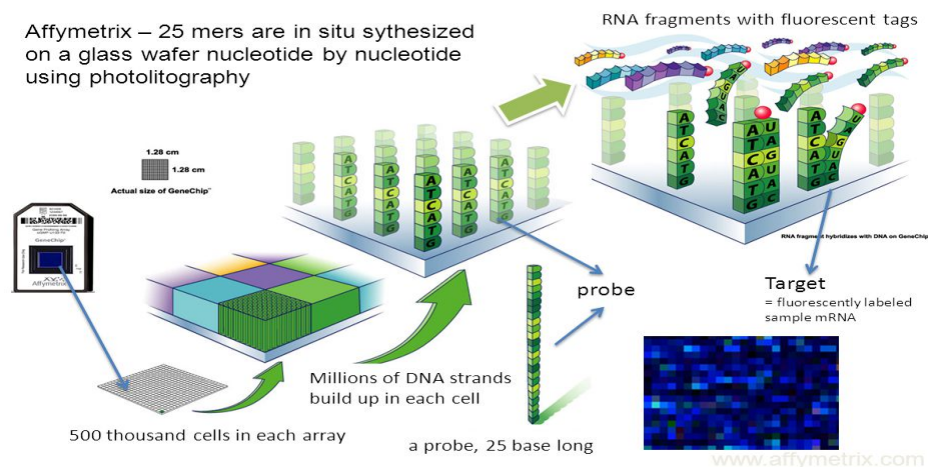
En general, los microarreglos, son capaces de brindar valores de expresión absoluta de un gen específico y permiten comparar dichos niveles entre dos grupos disímiles, como pueden ser pacientes vs. controles sanos [72].

Técnicamente, los microarreglos de DNA de un solo color (Figura 21) – en los que solo se analiza una muestra cada vez, como el usado en este estudio- parten de la extracción de RNA de alta calidad, de tejidos o células específicas [72] [73]. El RNA se retro-transcribe y el cDNA resultante sirve de template para una reacción de transcripción in vitro en la que se produce RNA marcado con biotina o cRNA [74], este se fragmenta e hibrida con las sondas que están fijadas previamente en el array, que no es más que en una superficie inerte de vidrio [72].

Específicamente los arrays de Affymetrix, usan sondas de oligonucleótidos de 25 pares bases de longitud (oligos) y para cada gen contenido en el chip, existen entre 11 y 20 pares de sondas; cada par de sondas incluye una secuencia de 25 nucleótidos, que es complementaria exactamente al gen blanco, y se denomina PM (Perfect Match por sus siglas en inglés); y otra secuencia que se diferencia de la PM sólo por el nucleótido en la posición 13, y se llama MM (Miss Match por sus siglas en inglés). El promedio de las diferencias entre las señales emitidas por las PM y MM para un gen, permite determinar su índice de expresión [73]. Se entiende además, que la hibridación con una sonda MM,

no es una expresión real y representa más bien una señal de fondo o background [75]; por lo que al utilizar múltiples sondas para un solo gen, es posible diferenciar entre las hibridaciones específicas y no específicas [73].

Terminada la hibridación y la remoción de moléculas de DNA mediante lavado, las placas de array son analizadas con un escáner laser que mide fluorescencia [72] [73]. La cantidad de fluorescencia en una localización específica, es directamente proporcional a la cantidad de cRNA hibridado. Altas concentraciones de fluorescencia indican una alta expresión génica [73].



**Figura 21.** Diagrama general del análisis de microarreglos de un solo color. Tomado de: One color microarrays [Internet]. Affymetrix. [citado 22 Enero 2016]. Disponible: [http://http://www.affymetrix.com/estore/about\\_affymetrix/media/image-library.affx#1\\_5](http://http://www.affymetrix.com/estore/about_affymetrix/media/image-library.affx#1_5)

Dada la gran cantidad de datos que se generan en un microarreglo, antes de efectuar un análisis estadístico, se requiere de una cuidadosa etapa de pre-procesamiento de los datos crudos, que incluye: el análisis de imagen, donde ocurre la corrección de background, que es eliminar todas las señales de hibridación no específica; la normalización, que corrige los sesgos técnicos y las diferencias sistemáticas entre las muestras; la transformación logarítmica y la sumariación, que busca asignar un único valor de expresión a cada gen, mediante métodos de reducción del número de sondas [72] [73] (recordemos que cada gen tiene entre 11 y 20 pares de sondas).



#### **2.5.4.1 Análisis de Datos de los microarreglos**

Las características clínicas de los pacientes, incluyendo los respectivos resultados para el estudio de la mutación en *FH*, se introdujeron en una base de datos y se aplicaron estadísticos descriptivos para su análisis. Durante este abordaje se utilizaron los software Excel y Acces de Microsoft office.

En cuanto a las concentraciones de fumarato en orina de los sujetos, con el fin de determinar si estas eran normales, elevadas o disminuidas, se realizó una comparación de los resultados obtenidos, con los estándares de referencia existentes para este metabolito en el contexto de la CG/EM.

#### **2.5.4.2 Expresión génica y pre-procesamiento de datos**

Las intensidades de las sondas de RNA fueron transformadas a intensidad génica y dispuestas en una tabla, usando la anotación del fabricante del chip. Se mantuvo la cantidad de mRNA para cada gen, como el valor máximo obtenido de todas las sondas de un gen. Ya que las intensidades no son directamente comparables entre los diferentes chips, los datos fueron calibrados por el método propuesto por Huber et al (2002) [76] por medio del paquete vsn de R Bioconductor, el cual esta disponible en la pagina <http://www.bioconductor.org/>. El método Huber realiza más que una simple calibración de los datos de un microarreglo basado en la media y permite la estabilización de la varianza. En este método, las varianzas de las intensidades transformadas se convierten en casi independientes de sus valores esperados, cambio que es similar a una transformación logarítmica en los rangos de intensidad altos, pero que no afecta las diferencias entre las muestras, en presencia de valores de intensidad baja, como si sucede en la transformación logarítmica [76].

#### **2.5.4.3 Detección de expresión génica entre casos y controles**

Para la detección de expresión diferencial se uso una prueba T modificada, propuesta por Tusher y colaboradores en 2001 [77] el método SAM (Significance Analysis of Microarrays, por sus siglas en inglés), que es usado para detectar genes

diferencialmente expresados, asignando un puntaje (análogo al estadístico  $t$ , llamado  $\delta_i$ ) a cada gen, basado en el cambio de la expresión media, relativa a la desviación estándar en repetidas mediciones. Para determinar si este puntaje es mayor que un umbral dado, la probabilidad (p-valor) se calcula basado en una serie de permutaciones hechas en repetidas mediciones, con lo que se genera una distribución de probabilidad. Además, el porcentaje de genes que podrían haber pasado el umbral, simplemente por azar, es también calculado y reportado como la FDR (False Discovery Rate, por sus siglas en inglés). De esta forma SAM, proporciona un doble filtro para falsos positivos [77].

La FDR es igual a  $FP/(FP+FN)$ , donde FP corresponde a los falsos positivos y FN a los falsos negativos. Brinda un porcentaje de falsos positivos, es decir genes que son declarados como diferencialmente expresados, cuando de hecho no lo son [78] [79] [80]. Valores de FDR por debajo de 1% (0.01) son ideales y deseables, pero es importante anotar que entre más astringente se sea con la FDR, menor será el número de genes diferencialmente expresados a evaluar, por lo que se aceptan FDR de entre 5 y 10% [79] [80] [81].

### **2.5.5 Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados**

Consistió en dos abordajes principales:

1. Se caracterizó individualmente cada uno de los genes de la lista de expresados a la alta y a la baja, mediante el uso de la base de datos Genecards versión 4 (<http://www.genecards.org>). Genecards, tiene entradas para más de 100.000 genes y de cada uno brinda, entre otros: información sobre función, ubicación cromosómica, términos de GO asociados (Gene Ontology, por sus siglas en inglés), así como principales vías e interacciones en las que se ha visto implicado el gen de interés. Es una plataforma de acceso libre con una antigüedad de 19 años, que se considera un compendio de información comprensiva y concisa de los genes humanos [82], el cual es automática y constantemente actualizado, y que se encuentra integrado por aproximadamente unas 125 bases de datos [83], dentro de las que se incluyen las fuentes publicas más relevantes como son NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés), ENSEMBL, HGNC (HUGO Gene Nomenclature

Committee, por sus siglas en inglés) y UniProtKB (UniProt Knowledgebase, por sus siglas en inglés) [82].

2. Se realizó un análisis de enriquecimiento de anotación génica, con el fin de extraer información conjunta, que permitiera inferir aspectos biológicos relevantes de las listas de genes a la alta y a la baja. Lo anterior, se hizo por medio de herramientas, que dieran valores de enriquecimiento cuantitativo mediante la aplicación de métodos estadísticos y que escanearán términos de anotación asociados a los genes [84], en bases de datos como Gene Ontology <http://geneontology.org>; que vale la pena decir, es un proyecto que ha desarrollado tres ontologías estructuradas para describir productos génicos, en términos de componente celular – donde esta localizado-, función molecular -actividad elemental que realiza- y procesos biológicos en los que el producto se encuentre envuelto. [85] [86] Contiene 40.000 términos de anotación, los cuales pueden ser manuales o automáticos, pero en cualquier caso sujetos a cambios y a revisiones periódicas. [86].

Así las cosas, se decidió usar los siguientes instrumentos:

- DAVID versión 6.7 <https://david.ncifcrf.gov> (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, por sus siglas en inglés): Recurso bioinformático capaz de extraer significados biológicos de listas génicas o proteicas. [84] Hace tanto un enriquecimiento singular como modular de los datos; el primero, desarrolla un análisis iterativo de cada término de anotación, uno por uno de forma lineal, después del cual los términos enriquecidos individualmente deben pasar un umbral de p-valor, para ser reportados en una tabla final [84] [87]. El estadístico utilizado en este caso es un test exacto de Fisher o puntaje EASE, aunque también DAVID permite el cálculo de la FDR como método de corrección; si bien queda a discreción del usuario tener en cuenta este último, ya que algunas veces la corrección de múltiples pruebas puede llegar a ser un abordaje muy conservador y disminuir globalmente la sensibilidad de los resultados de enriquecimiento [87]. Este tipo de enriquecimiento singular, se consigue con la tabla de anotación funcional en DAVID [87].

En relación al enriquecimiento modular, este implementa un análisis de relaciones

término-término, lo cual es algo más parecido a un escenario biológico real. Tiene en cuenta las inter-relaciones que existen entre los diferentes términos GO, en el cálculo del enriquecimiento. Se trata de una anotación en el contexto de red biológica y usa entre otros el estadístico Kappa [84]. Se logra obtener en el modulo de clustering de anotación funcional [87].

- Genecodis <http://genecodis.cnb.csic.es> (Gene annotations co-occurrence discovery, por sus siglas en inglés): Al igual que DAVID, puede hacer enriquecimientos singulares y modulares, no obstante son los últimos los más utilizados en esta base de datos [88]; que a diferencia de otras de su tipo puede correr análisis comparativos, elimina términos redundantes y no informativos, y además de tener en cuenta anotaciones de tipo GO, introduce en el análisis: anotación regulatoria, anotación farmacológica, anotaciones con PANTHER, pubmed, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes por sus siglas en inglés), miRNA (micro RNA), gráficos interactivos y otras funciones [89].

Toma como DAVID, una lista de genes y determina la anotación biológica o las combinaciones de anotaciones que estén enriquecidas, con respecto a una lista de referencia [88]; pero, antes de hacer la estadística pertinente (con distribución hipergeométrica y prueba de chi cuadrado) extrae todas las combinaciones que estén en un número x de genes, de acuerdo a un umbral definido por el usuario. Los p-valores resultantes, son luego ajustados por corrección múltiple (método de Benjamini - Hochberg) dando un valor de FDR [88].

Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis de enriquecimiento se hizo utilizando la tabla de anotación funcional de DAVID y corriendo un análisis modular en Genecodis, tanto para las listas de genes diferencialmente expresados a la alta como a la baja, de forma separada, como lo recomiendan Hong y colaboradores (2014) [90].

### **2.5.6 Construcción de redes con genes diferencialmente expresados**

Se quiso construir una red de interacciones génica, que logrará agrupar la lista de genes diferencialmente expresados a la alta y a la baja respectivamente. La herramienta, que

mostró tener un mejor rendimiento fue GeneMANIA (GeneMultiple Association Network Integration Algorithm por sus siglas en inglés) <http://genemania.org>, una aplicación de acceso libre, de la base de datos de interacciones Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>). GeneMania, permite la construcción de redes de interacción funcional de forma muy rápida y a partir de la lista de genes proporcionada por el usuario [91]. Da una representación grafica de una red en la que se resaltan los genes sometidos a análisis y los que pueden relacionarse a diferentes niveles por datos de: 1. Co- expresión, dos genes están vinculados si sus niveles de expresión son similares en estudios de expresión génica publicados y ligados a GEO (Gene Expression Omnibus por sus siglas en inglés); 2. interacción física, dos productos están ligados si se ha encontrado que tienen interacción proteína – proteína; 3. interacción genética, dos genes están relacionados si los efectos de uno perturban al otro; 4. dominios proteicos compartidos, dos genes están ligados si tienen el mismo dominio proteico; 5. co-localización, dos genes que están en el mismo tejido o sus proteínas están en la misma ubicación; 6. vías, dos genes que estén en la misma reacción de una ruta biológica; 7. relaciones funcionales predichas a partir de información de ontología; y 8. otros niveles, como medicamentos, motivos proteicos, miRNA, etc. que se relacionen con mas de dos genes, [92].

Asigna un puntaje de peso a cada vinculo de la red y cuando las listas de genes tienen más de 5 genes utiliza un algoritmo de regresión lineal, con el fin de que los genes de interés interactúen preferentemente entre si, y no tanto con los genes que no están en la lista [92] [93].

Dentro de las bases de datos que utiliza GeneMANIA están: GEO, BioGRID, NCBI, ENSEMBL e InterPro (Protein Analysis and clasification) [92] [93].

### **2.5.7 Identificación de blancos de *NRF2* en la lista de genes diferencialmente expresados**

Después de la anotación funcional, se prosiguió con la identificación de los posibles blancos de *NRF2* en el grupo de genes diferencialmente expresados a la alta y a la baja.

Para lograr dicha identificación, se partió de los datos publicados por 4 artículos especializados y se buscó cada uno de los genes diferencialmente expresados, en las diferentes listas de blancos proveídas en los materiales suplementarios de estas publicaciones:

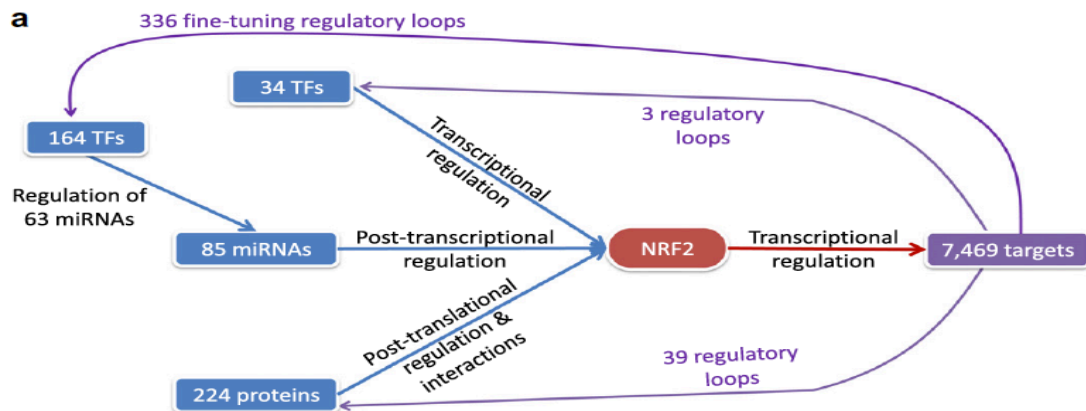
- Malhotra y colaboradores (2010) [94]: Su objetivo era determinar blancos directos de *NRF2*, usando células de fibroblastos embrionarios de ratón, en las que se procuró una acumulación nuclear del factor de transcripción -por knockout de *Keap1*- o una depleción del mismo, por un knockout de *Nrf2*. Las metodologías para la identificación de los blancos fueron ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation (ChIP) with massively parallel sequencing por sus siglas en inglés) y análisis de microarreglos. El resultado fue la tipificación de 645 blancos basales, 654 blancos directos y 244 genes en intersección, que eran comunes tanto en los análisis de expresión génica llevados a cabo en las células, como en la ChIP-seq, que se encargó de determinar los sitios de unión dentro del DNA de *Nrf2*.

La gran mayoría de blancos comprendían, genes relacionados con la proliferación y la supervivencia celular, mientras 244 estaban asociados a mecanismos antioxidantes y de detoxificación celular, cuya expresión se demostró era inducible [94].

- Chorley y colaboradores (2012) [95]: A partir de las conclusiones del trabajo de Malhotra et al [94], se suscita un gran interés por corroborar si en células humanas, *NRF2* también actuaría como un inductor de la expresión de cientos de genes a lo largo del genoma. De manera que, se sometieron células linfoides a tratamiento con dos activadores de *NRF2* (isotiocianato y sulfurano). Nuevamente la determinación de los sitios de unión a *NRF2* se hizo con ChIP-seq, y no solo se corroboró la presencia en los genes anteriormente descritos por Malhotra et al, de elementos ARE putativos asociados al factor de transcripción en estas células humanas, sino además se encontraron otros blancos cuyas funciones eran muy variadas: metabolismo de hem, apoptosis, muerte celular, respuesta inmune y

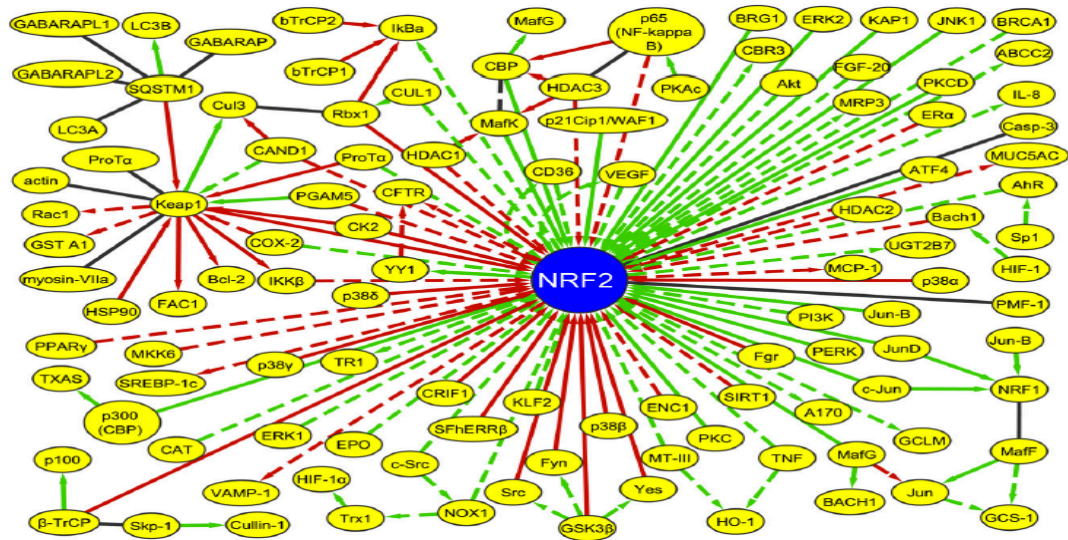
señalización por intermedio del receptor RXR alfa, que se ha relacionado con metabolismo lipídico y diferenciación de adipocitos.

- Papp, Korcsmáros y colaboradores (2012) [96]: Realizan una concienzuda búsqueda en toda literatura de las proteínas que interactúan con *NRF2*, así como de sus genes corriente abajo. Compila redes biológicas, loops regulatorios, blancos y demás correlacionados con NRF2, y es así como presenta un interactoma y un reguloma de este gen (Figura 22 y 23). Los autores se valieron de protocolos de curación manual, procedimientos de predicción e importación de información de otras bases de datos, con todo esto lograron encontrar gran cantidad interacciones proteicas nunca antes reportadas. Estos datos servirían luego para la construcción, por este mismo grupo de investigación, de la base NRF2ome, (ver a continuación).



**Figura 22.** Estructura de la base de datos construida para establecer el interactoma y reguloma de *NRF2*.

Tomado de: Papp D, Lenti K, Módos D, Fazekas D, Korcsmáros T et al. The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. FEBS Lett. 2012;586(13):1795-802.



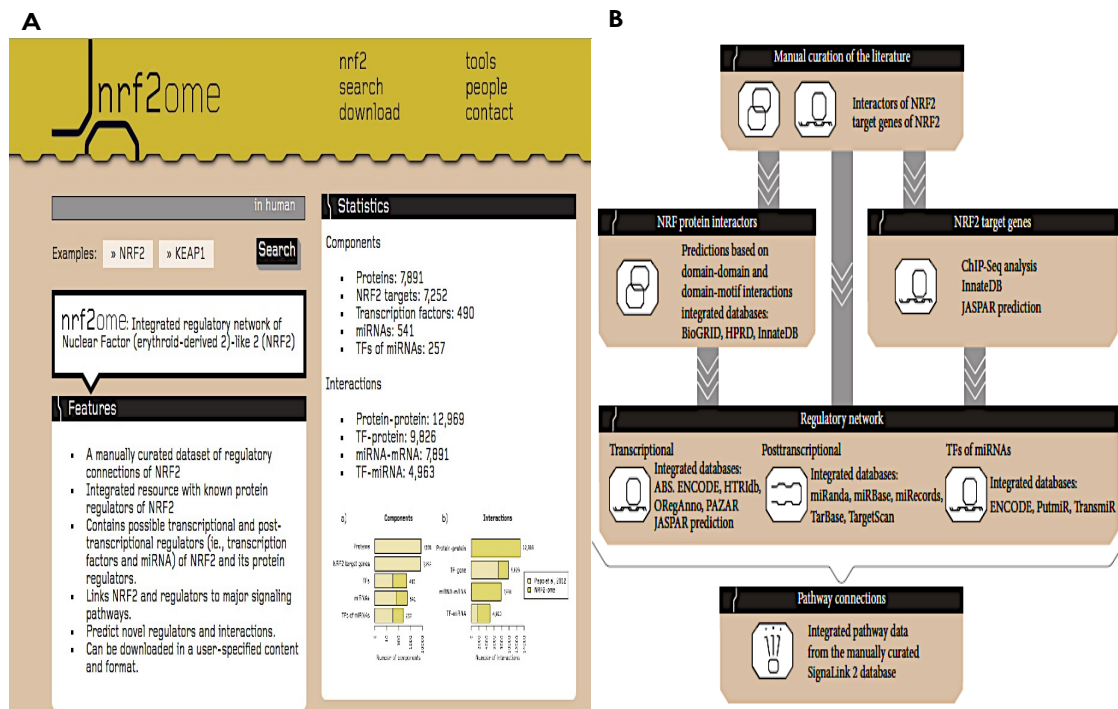
**Figura 23.** Red de NRF2, a partir de únicamente de datos manualmente curados. Las líneas rojas y verdes, denotan inhibición y activación respectivamente. Por otro lado, las líneas punteadas son interacciones indirectas y las líneas sólidas interacciones directas.

Tomado de: Papp D, Lenti K, Módos D, Fazekas D, Korcsmáros T et al. The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. FEBS Lett. 2012;586(13):1795-802.

- Türei, Korcsmáros y colaboradores (2013) [97]: Dada la inusitada relevancia de las vías relacionadas con *NRF2* en los últimos años y su rol cada vez más claro en procesos antitumorales como protumorales, enfermedades neurodegenerativas y trastornos inmunes, Türei, Korcsmáros y colaboradores, desarrollan un recurso online abierto denominado el NRF2ome (<http://nrf2.elte.hu/search>), que es una base de datos integrada, que contiene casi todas las interacciones conocidas de *NRF2* tanto manualmente curadas como aquellas fruto de predicciones bioinformáticas (Figura 24). Alimentada por numerosas bases externas como ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements, por sus siglas en inglés), HTRIdb (Human Transcriptional Regulation Interactions database por sus siglas en inglés), JASPAR, BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets por sus siglas en inglés), InnateDB y PutmiR (Figura 22 - panel B), da cuenta de todo el interactoma de *NRF2*, que comprende sus blancos y sus loops regulatorios transcripcionales y postranscripcionales, de los que también se encuentra en esta herramienta, detalles no solo de su interacción con *NRF2* sino con otras proteínas o factores de transcripción (Figura 25). Una de sus principales ventajas es que permite descargar toda la base de datos en formato csv.



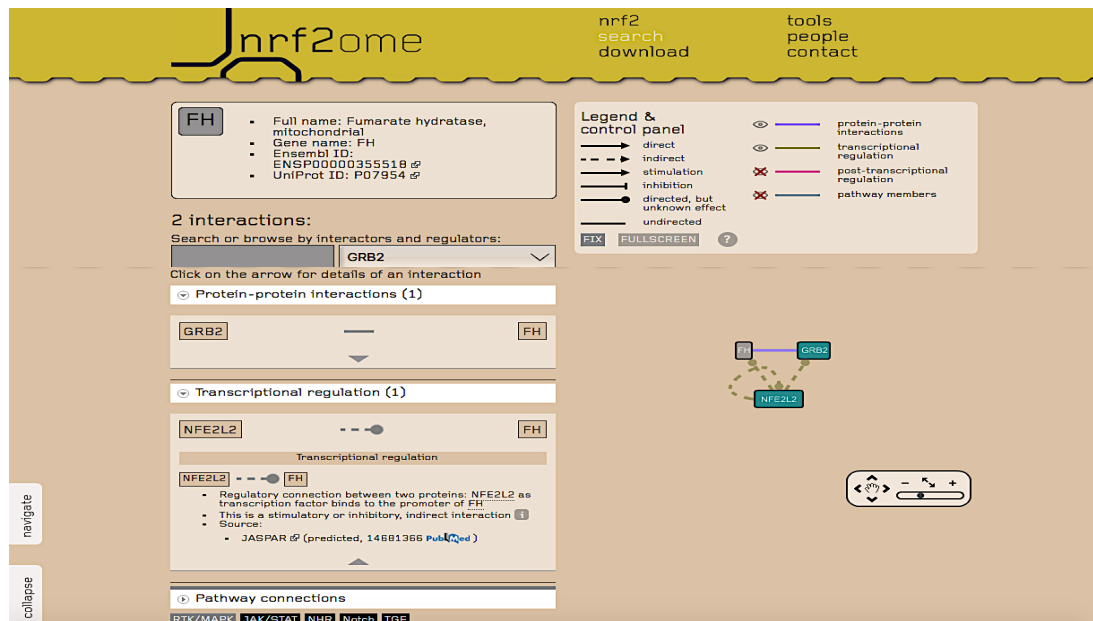
Concretamente, para conformar la lista de genes blanco de NRF2 –que actualmente es de 7252- Túrei, Korcsmáros y colaboradores hicieron uso de literatura previa curada, datos integrados en InnateDB, los estudios de ChIP-seq de Malhotra et al y Chorley et al y las predicciones obtenidas por JASPAR <http://jaspar.genereg.net>, que es una base de datos de acceso libre donde se pueden encontrar perfiles anotados de factores de transcripción eucariotas, que son exclusivamente producto de grupos de secuencias de nucleótidos, que se hayan demostrado experimentalmente, se unen a cierto factor de transcripción [98].



**Figura 24.** A. Visión general de la pagina de inicio de NRF2ome. B. Esquema del proceso de compilación de información de NRF2ome.

A. Tomado de: NRF2-ome [Internet]. [citado 22 Enero 2016]. Disponible: <http://nrf2.elte.hu/search>

B. Tomado de: Túrei D, Papp D, Fazekas D, Lenti K, Korcsmáros T et al. NRF2-ome: An integrated web resource to discover protein interaction and regulatory networks of NRF2. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013(1):1-9.



**Figura 25.** Ejemplo de la información proporcionada por NRF2ome.  
Tomado de: A. Tomado de: NRF2-ome [Internet]. [citado 22 Enero 2016]. Disponible:  
<http://nrf2.elte.hu/protein/P07954>

### 2.5.8 Validación por RT-PCR (Real Time PCR, por sus siglas en inglés)

La técnica de RT-PCR también llamada PCR cuantitativa, es ampliamente usada como método de validación para estudios transcriptómicos [99] [100] [101].

En nuestro caso particular se optó por un ensayo TaqMan, que estuvo a cargo de MacroGen Inc. (Seúl, Corea) y fue ejecutado en todas las muestras de RNA que habían sido originalmente empleadas para el análisis de microarreglos. Sin embargo, debido a la poca cantidad de muestra que quedo luego de dicho procedimiento, solo fue posible la validación de tres genes diferencialmente expresados (dos a la alta y uno a la baja), que se eligieron de forma tal, que fuesen blancos o genes íntimamente relacionados con *NRF2*. El gen housekeeping fue *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

La búsqueda de los primers, para este ensayo se hizo en la pagina de ThermoFisher: <http://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>, en donde se buscaron cebadores específicos para el correspondiente probe ID de cada gen. En esta pagina se despliegan los cebadores con mejor cobertura para la secuencia del probe ID dado.

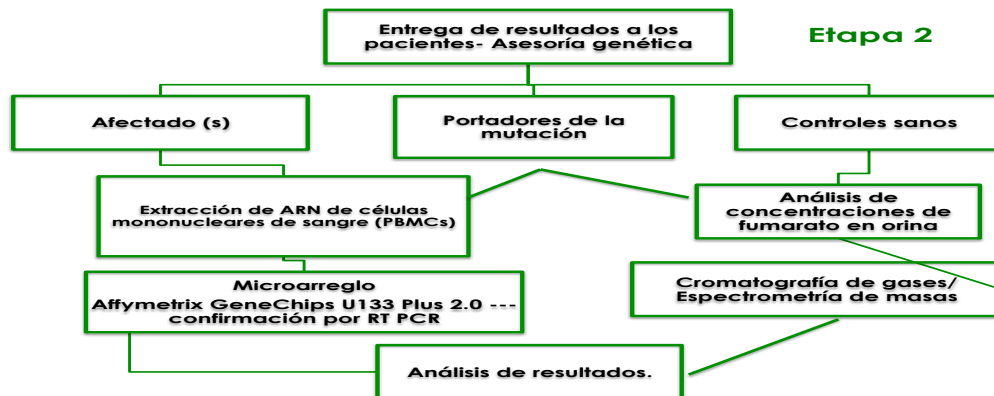
Para la síntesis del cDNA, se utilizó la Superscript™- RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este proceso se hizo en 500 ng de RNA (42 °C) cuya calidad se había determinado previamente como óptima y sin contaminación de DNA.

La RT-PCR, se realizó en el equipo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.). Las condiciones de reacción óptimas se obtuvieron con 5 ul de master mix universal (Applied Biosystems) la cual contiene dNUTPs, MgCl<sub>2</sub>, buffer, AmpliTaq Gold, 90 nM de primers y 250 nM de sonda TaqMan marcada con fluorescencia; a esta mezcla se le añadieron 2 ul de cDNA. El programa de termociclado fue el siguiente: denaturación a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto.

Las muestras se amplificaron en triplicado y los datos se analizaron en el software Sequence Detector (Applied Biosystems).

Se hizo una cuantificación relativa y se calcularon los fold change (de las muestras de los pacientes respecto a los controles) utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta c(T)}$ .

De otra parte, para determinar si la validación fue exitosa, se compararon los fold change obtenidos con el microarreglo y la RT-PCR, para cada uno de los tres genes, y se analizó si la expresión por ambas técnicas arrojaba resultados de expresión diferencial en la misma dirección.



**Figura 26.** Diagrama de flujo- Metodología segunda etapa.

## 2.6 Consideraciones Éticas

Este trabajo de investigación, tuvo en cuenta las consideraciones de la Declaración de Helsinki [102], que imparte las pautas básicas para los estudios en seres humanos y señala entre otros, la importancia del respeto a los derechos de los sujetos de investigación, a quienes se prepondera sobre la ciencia y la sociedad. También se basa en lo estipulado en el Reporte Belmont [103], especialmente en lo referente a la protección de los individuos que participan en una investigación científica. Y en cuanto a la normatividad colombiana, esta propuesta cumplió con lo establecido en la Resolución 8430 de 1993 [104], por la cual se dictan las normas para la realización de investigaciones en salud en el país.

Así las cosas, el presente trabajo –de acuerdo con lo expuesto en la Resolución 8430 - fue un estudio con riesgo mínimo: “Son estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: (...) colección de excretas y secreciones externas, (...) extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud (...)” (Tomado de [104]).

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina (Acta No. 002-013-15 del 12 de Febrero de 2015).

Durante el desarrollo de esta investigación además se hizo lo siguiente:

- Se informó adecuadamente sobre los objetivos, duración, diseño metodológico básico, riesgos y beneficios del estudio a cada voluntario, a los cuales también se les explicaron sus derechos como sujeto de investigación.
- La participación, por parte de los individuos fue totalmente voluntaria y no se impidió de ninguna forma que el sujeto se retirara en cualquier momento; este derecho a ejercer su autonomía se enfatizó. Tampoco se ejercieron presiones o se utilizaron incentivos, para retener a los participantes; se hizo hincapié en que el hecho de rehusarse a hacer parte del estudio, no traería ningún tipo de consecuencia deletérea.

- Se protegió la intimidad de los datos proporcionados por los pacientes, al realizar una codificación de las muestras con el fin de mantener la privacidad de sus resultados; y estos solo se comunicaron al individuo de forma personal. Los análisis de mutación en línea germinal de *FH* se dieron a conocer al paciente en el contexto de una consulta de genética clínica.
- Se comunicó a los participantes, una vez finalizado el estudio, los hallazgos principales de la investigación.
- Se realizó la firma de dos consentimiento informados, uno específico para el análisis de mutación en *FH* en todos los pacientes (Anexo B) y otro para el análisis de perfiles de expresión en NRF2 en el afectados y los portadores identificados por el primer método, y los controles sanos (Anexo B).  
En los menores de edad, se realizó además un asentimiento informado.
- El resultado de análisis de mutación de los menores de edad fue entregado y explicado a los padres, a quienes se les asesoró para comunicar dicho reporte a sus hijos cuando cumplan la mayoría de edad, no obstante el seguir esta directriz quedó a discreción de los acudientes. Vale la pena mencionar, que ningún menor de edad dio positivo en el análisis de mutación.
- Se protegió en todo momento la integridad física y psicosocial de los participantes.

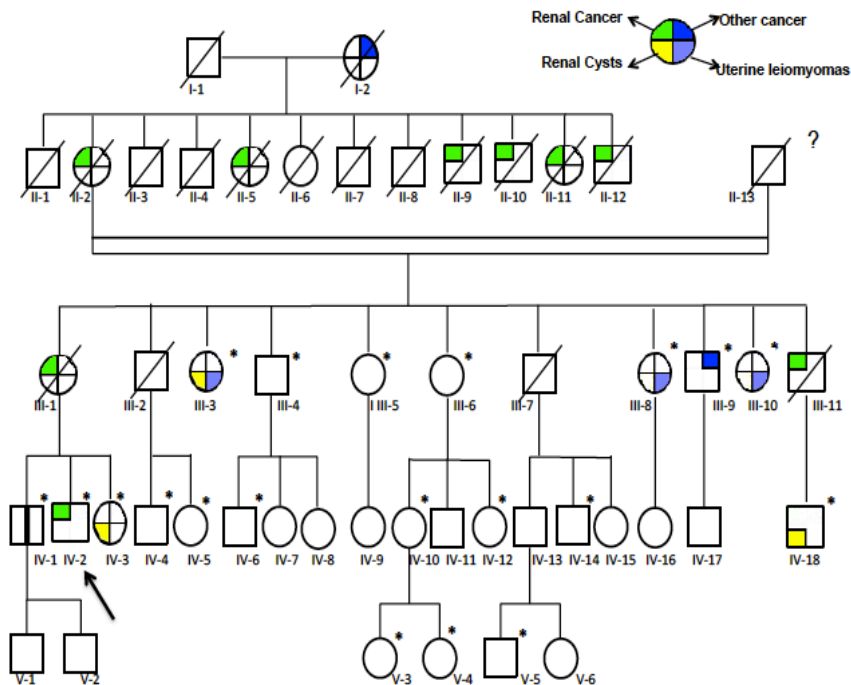
***Los investigadores declaran que no tienen conflictos de interés para la realización de este trabajo de investigación. No se contó con ningún tipo de financiación para la ejecución de este proyecto.***

### 3. Resultados

#### 3.1 Primera etapa

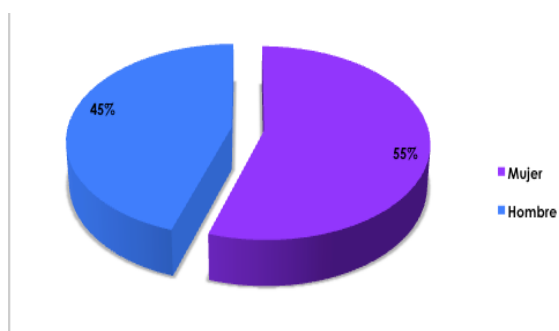
##### 3.1.1 Generalidades de la población de estudio

Este trabajo contó con la participación de 20 pacientes, incluyendo el probando. El árbol genealógico se construyó, de acuerdo con los datos aportados por los miembros de la familia (Figura 27) y en este puede apreciarse, 8 individuos fallecidos por cáncer renal metastásico a edades tempranas (II-2, II-5, II-9, II-10, II-11, II-12, III-1, III-11) sin que en ninguno de ellos se documentaran leiomiomas cutáneos. En el caso de las mujeres, (II-2, II-5, II-11, III-1) no se conoce con certeza si presentaban fibromas uterinos.



**Figura 27.** Árbol genealógico de la familia de estudio. II-2 y II-13 eran primos. Sin información disponible del individuo II-13. El sujeto IV-2 es el probando, afectado por el cáncer renal papilar tipo 2. El paciente III-9 resulto positivo para la mutación en línea germinal de *FH*; tenía antecedente de carcinoma basocelular de piel y tumor de células de Sertoli. Aquellos miembros con un asterisco a lado derecho corresponden a los 20 participantes, en los que se realizó análisis de mutación en *FH*.

Del total de participantes, un 55% (n=11) eran mujeres y un 45% (n=9) hombres. (Figura 28)

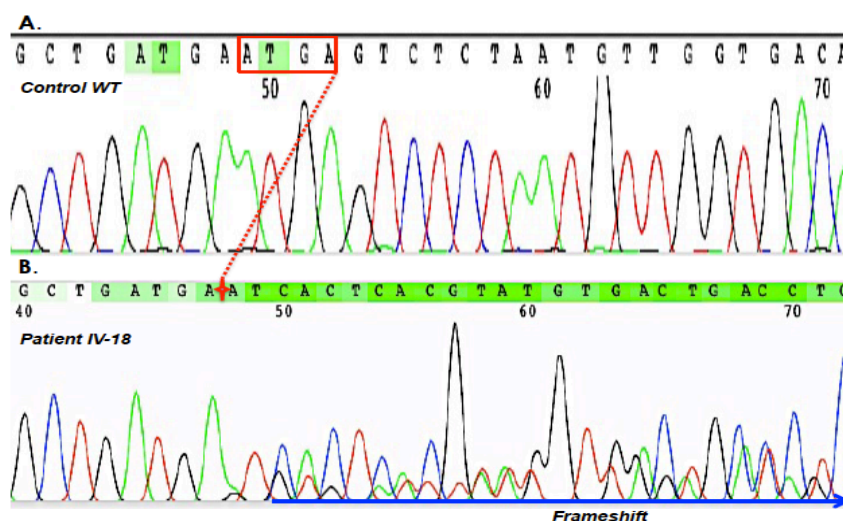


**Figura 28.** Distribución por género de los participantes.

El rango de edad de los pacientes estuvo entre 12 a 67 años en mujeres y 13 a 65 años en hombres. La edad promedio de los hombres fue 36.4 años y de las mujeres 41.1 años.

### 3.1.2 Análisis mutacional

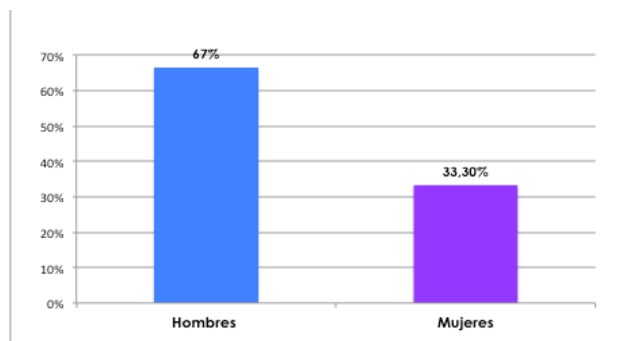
La mutación heterocigota c.1349\_1352delATGA encontrada en el probando, se evidenció en otros 5 miembros de la familia, los individuos III-3, III-10, III-9, IV-1, IV-2 y IV-18. (Figura 29)



**Figura 29.** Secuencia parcial del electroferograma del gen *FH* – exón 9. Un ejemplo de la mutación encontrada en todos los sujetos. A. Individuo con la secuencia control o wild type. B. Paciente IV-18 con la mutación c.1349\_1352delATGA. La línea roja muestra la posición de la deleción y la línea azul el frameshift.

### 3.1.3 Datos clínicos de los pacientes positivos para la mutación

En la Tabla 1 y 2, se resumen las principales características de los pacientes que presentaron la mutación. La mayoría son hombres con 66.6% y las mujeres representan el 33.3%. (Figura 30)



**Figura 30.** Distribución por genero de los pacientes que resultaron positivos para el análisis de mutación.

Del grupo de pacientes masculinos, el probando es el único con antecedente de cáncer renal papilar tipo 2. Por otro lado, el individuo III-9, fue diagnosticado con un tumor de células de Sertoli en el testículo derecho, así como un carcinoma basocelular, ambos ahora en remisión; la relación de estas dos neoplasias con el HLRCC, se discutirá más adelante.

Los quistes renales, solo se han reportado en el hombre IV-18. El sujeto IV-1 no tiene ninguna manifestación del Síndrome y se considera portador asintomático por el momento. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Datos clínicos relevantes pacientes masculinos.

| Pacientes | Edad en años | Mutación de línea germinal en FH | Cáncer renal papilar tipo2 (Edad de diagnostico en años) | Quistes renales (Edad de diagnostico en años) | Otros cánceres   |
|-----------|--------------|----------------------------------|--|---|--|
| III-9     | 53           | c.1349_1352delATGA               | No   | No  | -Tumor de células de Sertoli<br>-Carcinoma basocelular de piel |
| IV-1      | 41           | c.1349_1352delATGA               | No   | No  | No   |
| IV-2      | 38           | c.1349_1352delATGA               | Sí (35)  | No  | No   |
| IV-18     | 30           | c.1349_1352delATGA               | No   | Sí (28)                                       | No   |



Ambas mujeres con la mutación, tienen antecedente de leiomiomas uterinos con inicio antes de los 40 años y requirieron histerectomía temprana por esta misma causa. La paciente III-3 tiene quistes renales bilaterales. (Tabla 2).

**Tabla 2.** Datos clínicos relevantes pacientes femeninos.

| Pacientes | Edad en años | Mutación de línea germinal en FH | Quistes renales (Edad de diagnóstico en años) | Leiomiomas uterinos                               |               |                             |
|-----------|--------------|----------------------------------|---|---|---------------|-----------------------------|
|           |              |                                  |   | Leiomiomas uterinos (edad de diagnóstico en años) | Tratamiento   | Edad de tratamiento en años |
| III-3     | 67           | c.1349_1352delATGA               | Sí (65)                                       | Sí (38)   | Histerectomía | 40                          |
| III-10    | 55           | c.1349_1352delATGA               | No  | Sí (33)   | Histerectomía | 35                          |

Llama la atención, los antecedentes de las pacientes II-8 y IV-3. (Figura 22). La primera tiene antecedente de leiomiomas uterinos, a los 54 años y tratamiento con histerectomía a los 55 años de edad, edades tardías para los estándares normales en el Síndrome HLRCC. Por su parte la mujer IV-3, tiene quistes renales bilaterales pequeños. Ninguna presentó la mutación para FH.

En ninguno de los pacientes positivos para mutación en FH, se encontró al examen físico leiomiomas cutáneos.

Resulta, importante mencionar que un breve reporte de la mutación en FH que aquí se describe, junto con una descripción de la familia, fue presentado como poster y publicado en forma de *abstract*, en el marco del Catorceavo Simposio Internacional de Cáncer Renal de la Asociación de Cáncer Renal de los Estados Unidos; evento que se llevo a cabo en el mes de Noviembre de 2015 en la ciudad de Miami, Florida. El *abstract*, puede ser consultado en la pagina: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bju.13365/abstract>.

Además, un articulo completo ya fue sometido para publicación a revista indexada y actualmente esta en fase de revisión (Anexo A).

### 3.2 Segunda etapa

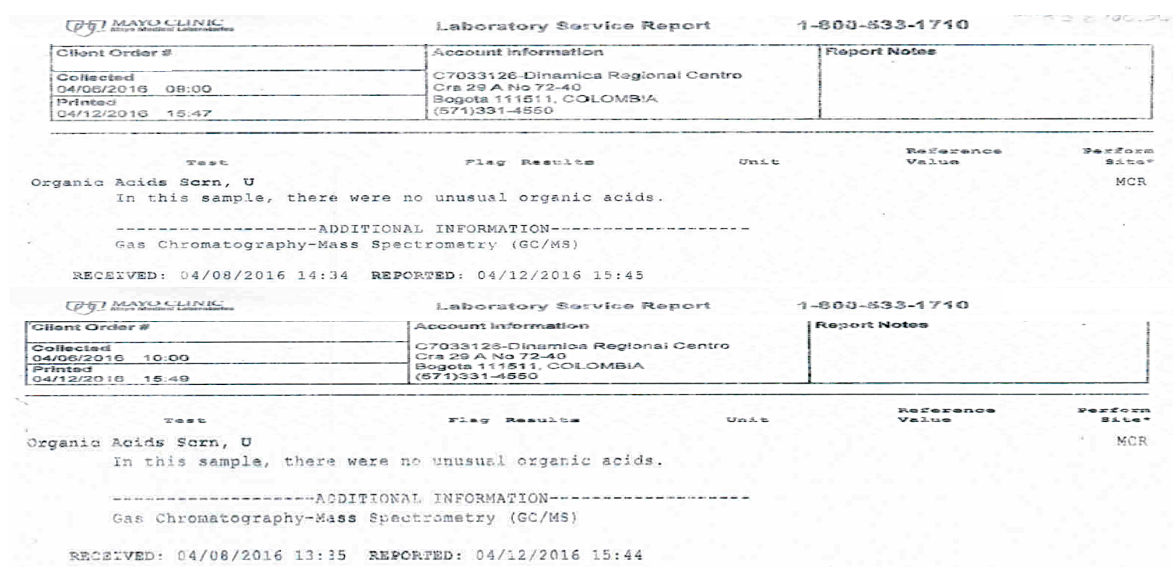
Para esta fase, se contó con la participación de tres pacientes con la mutación de línea germinal en *FH*, que incluyeron el probando. Específicamente, para el análisis de microarreglos, se tomaron también muestras de tres controles sanos no relacionados. La codificación de las muestras se hizo de la siguiente manera:

- ✓ Paciente 1- Probando: CP1, Paciente No. 2: CP2, Paciente No 3: CP3-NEW.
- ✓ Control No 1: CN1, Control No 2: CN2-REP, Control No 3: CN3-REP.

#### 3.2.1 Concentraciones de fumarato en orina

Tal y como se enunció en la metodología, se realizó la medición de las concentraciones de fumarato en orina en los pacientes, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Dicho abordaje, solo pudo realizarse en dos de los tres pacientes que aceptaron continuar con la segunda etapa de este estudio, ya que el tercer individuo no se encontraba disponible para la toma de muestras.

De manera, que se obtuvieron las concentraciones de ácidos orgánicos de cadena corta y media en orina, en el probando y otro paciente. No se evidenciaron alteraciones en las concentraciones de fumarato, malato u otro ácido orgánico.



**Figura 31.** Resultados ácidos orgánicos en orina por CG/CM.

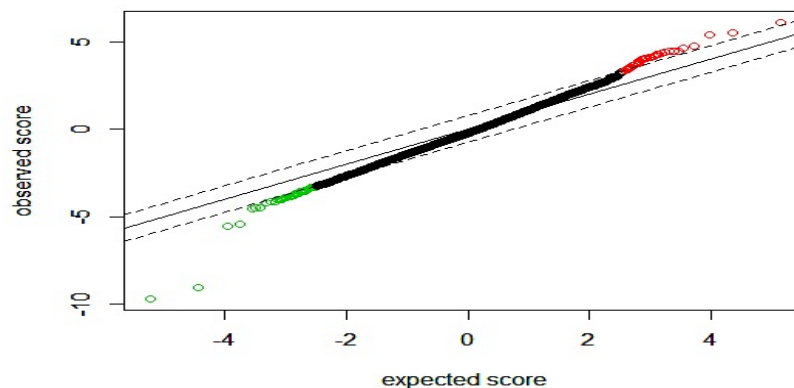
### 3.2.2 Análisis de microarreglos

Para el análisis de microarreglos, se realizó la extracción de RNA de PBMCs, de tres pacientes y de tres controles sanos no relacionados, con lo que se cumplió con el número mínimo de replicas biológicas por grupo, para poder realizar inferencias estadísticas [105] [106] [107].

Los datos del conteo y viabilidad celular, así como las especificaciones de las muestras de RNA, se enuncian en la Tabla del Anexo E.

En cuanto al análisis de microarreglos, se partió de una base de datos cruda de 54.675 sondas, que luego del pre-procesamiento de datos (Anexo E), que incluyó una sumarización y estabilización de varianza usando la librería vsn de bioconductor en el programa R (Huber et al, 2002), logró arrojar información para 18.002 genes, los cuales fueron analizados con el método SAM en la librería siggenes de bioconductor (Schwender, 2012); se detectaron entonces 81 genes diferencialmente expresados con una FDR de 0.1 (10%) a un valor delta 0.769 (Figura 32), en las muestras de los pacientes con la mutación en FH, respecto a los controles sanos no relacionados.

Dentro de este orden de ideas, se hallaron 38 genes expresados a la alta y 43 a la baja (Figura 33 y Tablas 3 y 4); no obstante, se filtraron aquellos no codificantes, con lo que el número final se redujo a 30 y 32 genes, respectivamente (Tablas 5 y 6).



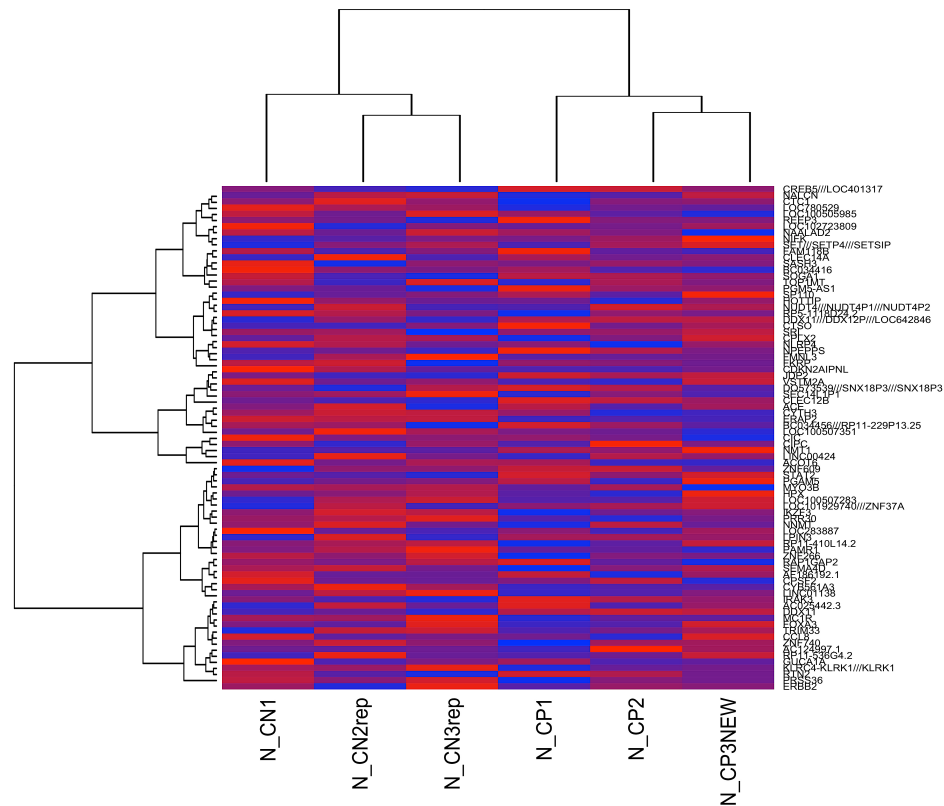
**Figura 32.** Grafica obtenida en SAM con un delta de 0.769. En rojo genes expresados a la alta y en verde aquellos a la baja.

**Tabla 3.** Genes diferencialmente expresados a la alta obtenidos con estadístico SAM.

| Gene Name                  | Row | Gene ID | Score(d) | Numerator(r) | Denominator(s+s0) | Fold Change | q-value(%)  |
|----------------------------|-----|---------|----------|--------------|-------------------|-------------|-------------|
| ERAP2                      | 1   | 4494    | g4493    | 6,102360391  | 1,242913667       | 0,203677526 | 2,366760408 |
| CYTH3                      | 2   | 3607    | g3606    | 5,528712389  | 0,622829667       | 0,112653657 | 1,539892529 |
| ACE                        | 3   | 233     | g232     | 5,375759693  | 1,088626667       | 0,202506572 | 2,126714934 |
| CLEC12B                    | 4   | 2952    | g2951    | 4,740107978  | 1,591713          | 0,335796781 | 3,014070161 |
| SEC14L1P1                  | 5   | 14391   | g14390   | 4,612053535  | 0,755247333       | 0,16375511  | 1,687920942 |
| DQ573539//SNX18P3//SNX18P3 | 6   | 4106    | g4105    | 4,479094904  | 0,995030667       | 0,222149941 | 1,993122892 |
| VSTM2A                     | 7   | 17075   | g17074   | 4,475068636  | 1,539513667       | 0,344020124 | 2,90696493  |
| JD2P                       | 8   | 6792    | g6791    | 4,449570179  | 0,901240667       | 0,202545556 | 1,867671424 |
| CDKN2AIPNL                 | 9   | 2695    | g2694    | 4,413553418  | 0,960905667       | 0,217717013 | 1,946531467 |
| FKRP                       | 10  | 5113    | g5112    | 4,32020961   | 1,130443667       | 0,261664079 | 2,189260554 |
| FMNL3                      | 11  | 5207    | g5206    | 4,270424634  | 0,701167          | 0,1641914   | 1,625819391 |
| NPEPPS                     | 12  | 11194   | g11193   | 4,264192973  | 1,048474333       | 0,245878725 | 2,068341396 |
| NLRP4                      | 13  | 11127   | g11126   | 4,222606765  | 1,094248          | 0,259140399 | 2,135017655 |
| CPLX2                      | 14  | 3212    | g3211    | 4,196270504  | 0,846544          | 0,201737233 | 1,798188172 |
| SRL                        | 15  | 15351   | g15350   | 4,132046003  | 0,835425667       | 0,202182083 | 1,784383443 |
| CTSO                       | 16  | 3485    | g3484    | 4,126405196  | 0,927513333       | 0,224775147 | 1,901994841 |
| DDX11//DDX12P//LOC642846   | 17  | 3723    | g3722    | 4,034043716  | 0,660878          | 0,163825195 | 1,581044528 |
| RP5-1118D24.2              | 18  | 13981   | g13980   | 4,027133178  | 0,324893          | 0,080676001 | 1,252571536 |
| NUDT4//NUDT4P1//NUDT4P2    | 19  | 11323   | g11322   | 4,024029996  | 0,392678          | 0,097583269 | 1,312828078 |
| HOTTIP                     | 20  | 6255    | g6254    | 4,013433813  | 0,565309          | 0,140854198 | 1,479704402 |
| SP110                      | 21  | 15190   | g15189   | 4,002868956  | 1,4416            | 0,360141692 | 2,716219369 |
| PGM5-AS1                   | 22  | 11919   | g11918   | 3,901430085  | 0,985507333       | 0,252601562 | 1,980009474 |
| TOP1MT                     | 23  | 16370   | g16369   | 3,877846295  | 0,580343667       | 0,149656181 | 1,495205381 |
| SOGA1                      | 24  | 15150   | g15149   | 3,781941561  | 0,445959333       | 0,117918092 | 1,362219636 |
| BC034416//FXR1             | 25  | 1416    | g1415    | 3,712078619  | 0,642858          | 0,173180061 | 1,561419292 |
| SASH3                      | 26  | 14281   | g14280   | 3,682163858  | 1,571414          | 0,426763735 | 2,971958561 |
| CLEC14A                    | 27  | 2953    | g2952    | 3,646374471  | 1,533346667       | 0,420512671 | 2,894565226 |
| FAM118B                    | 28  | 4675    | g4674    | 3,633319151  | 0,536111333       | 0,147554154 | 1,45005873  |
| SET//SETP4//SETSIP         | 29  | 14488   | g14487   | 3,538359065  | 0,686336          | 0,193970139 | 1,609191475 |
| NIFK                       | 30  | 11078   | g11077   | 3,517876425  | 1,728367667       | 0,491309943 | 3,313526981 |
| NAALAD2                    | 31  | 10834   | g10833   | 3,501101115  | 0,633080333       | 0,180823208 | 1,550872767 |
| LOC102723809               | 32  | 9182    | g9181    | 3,482175001  | 0,547534667       | 0,157239273 | 1,461585946 |
| REEP3                      | 33  | 12996   | g12995   | 3,441096893  | 0,700569333       | 0,203588959 | 1,625146    |
| LOC100505985               | 34  | 8231    | g8230    | 3,413410083  | 0,313395667       | 0,091813072 | 1,242629033 |
| LOC780529                  | 35  | 9725    | g9724    | 3,389983217  | 0,471008667       | 0,138941297 | 1,386078212 |
| CTC1                       | 36  | 3383    | g3382    | 3,384921843  | 0,604105          | 0,178469409 | 1,520035481 |
| NALCN                      | 37  | 10856   | g10855   | 3,367113417  | 1,167221333       | 0,346653406 | 2,245787359 |
| CREB5//LOC401317           | 38  | 3257    | g3256    | 3,353577706  | 1,048023          | 0,312508936 | 2,067694436 |

**Tabla 4.** Genes diferencialmente expresados a la baja obtenidos con estadístico SAM.

| Gene name                | Row | Gene ID | Score(d) | Numerator(r) | Denominator(s+s0) | Fold Change | q-value(%)  |
|--------------------------|-----|---------|----------|--------------|-------------------|-------------|-------------|
| ERBB2                    | 1   | 4495    | g4494    | -9,696210943 | -1,757833667      | 0,181290782 | 0,295691839 |
| PRSS36                   | 2   | 12548   | g12547   | -9,056174166 | -1,004257         | 0,110891971 | 0,498526811 |
| RTN2                     | 3   | 14193   | g14192   | -5,551935278 | -1,081032667      | 0,194712765 | 0,472690355 |
| KLRC4-KLRK1//KLRK1       | 4   | 7160    | g7159    | -5,40560184  | -1,128915667      | 0,208841809 | 0,457259273 |
| GUCA1A                   | 5   | 5917    | g5916    | -4,539086495 | -0,601183         | 0,132445813 | 0,659213183 |
| RP11-536G4.2             | 6   | 13670   | g13669   | -4,509293218 | -0,627501667      | 0,139157433 | 0,647296377 |
| AC124997.1               | 7   | 208     | g207     | -4,508520073 | -0,72304          | 0,160371915 | 0,605819533 |
| ZNF740                   | 8   | 17870   | g17869   | -4,198146142 | -0,386833667      | 0,092143926 | 0,764806311 |
| CCL8                     | 9   | 2539    | g2538    | -4,161148744 | -0,444353333      | 0,106786217 | 0,734913657 |
| TRIM33                   | 10  | 16502   | g16501   | -4,133097993 | -0,438420667      | 0,106075556 | 0,737941999 |
| FOXA3                    | 11  | 5238    | g5237    | -4,054896565 | -0,37612          | 0,09275699  | 0,770507017 |
| MC1R                     | 12  | 10129   | g10128   | -4,023858606 | -0,501032         | 0,12451531  | 0,706601149 |
| MED1                     | 13  | 10179   | g10178   | -3,999523878 | -0,362352667      | 0,090598951 | 0,777894997 |
| AC025442.3               | 14  | 170     | g169     | -3,914093308 | -0,652586333      | 0,166727332 | 0,636138879 |
| IRAK3                    | 15  | 6688    | g6687    | -3,908273179 | -0,875035667      | 0,223893169 | 0,545240387 |
| LINC01138                | 16  | 7816    | g7815    | -3,858346987 | -0,581869667      | 0,150808019 | 0,668097393 |
| CYB561A3                 | 17  | 3544    | g3543    | -3,84533474  | -0,548365         | 0,14260527  | 0,683794631 |
| CPSF2                    | 18  | 3228    | g3227    | -3,799924683 | -0,646535         | 0,170144162 | 0,638812744 |
| AF186192.1               | 19  | 422     | g421     | -3,781236286 | -0,441006667      | 0,116630285 | 0,736620439 |
| SEMA4D                   | 20  | 14430   | g14429   | -3,749069859 | -0,404522         | 0,107899296 | 0,755486562 |
| RAP1GAP2                 | 21  | 12849   | g12848   | -3,69286355  | -0,618918         | 0,167598394 | 0,651159104 |
| ZNF266                   | 22  | 17580   | g17579   | -3,671297961 | -0,394867667      | 0,107555331 | 0,760559137 |
| PAMR1                    | 23  | 11644   | g11643   | -3,65812073  | -0,330672333      | 0,090394046 | 0,795165829 |
| RP11-410L4.2             | 24  | 13556   | g13555   | -3,630068923 | -0,399253667      | 0,109985148 | 0,758250439 |
| LPI3                     | 25  | 9758    | g9757    | -3,564779874 | -0,362180333      | 0,101599635 | 0,777987924 |
| LOC283887                | 26  | 9381    | g9380    | -3,562163901 | -0,510925667      | 0,143431263 | 0,70177202  |
| NNMT                     | 27  | 11145   | g11144   | -3,547893316 | -0,724387667      | 0,204174027 | 0,605253882 |
| PRR30                    | 28  | 12521   | g12520   | -3,536758842 | -0,355264333      | 0,100449126 | 0,781726401 |
| IKZF3                    | 29  | 6551    | g6550    | -3,514906719 | -1,034329333      | 0,294269355 | 0,488242797 |
| LOC101929740//ZNF37A     | 30  | 9095    | g9094    | -3,508735846 | -0,8536           | 0,243278502 | 0,553402091 |
| LOC100507283             | 31  | 8347    | g8346    | -3,488814074 | -0,451128         | 0,129306977 | 0,731470709 |
| HPX                      | 32  | 6305    | g6304    | -3,464903806 | -0,337193667      | 0,097316891 | 0,791579597 |
| MYO3B                    | 33  | 10791   | g10790   | -3,447465292 | -0,310712333      | 0,090127763 | 0,806243577 |
| PGAM5                    | 34  | 11899   | g11898   | -3,401898634 | -0,321333333      | 0,094457057 | 0,800329874 |
| STAT2                    | 35  | 15463   | g15462   | -3,373891368 | -0,504785667      | 0,14961527  | 0,704765073 |
| ZNF609                   | 36  | 17796   | g17795   | -3,354218232 | -0,485682         | 0,144797376 | 0,714159388 |
| ACOT6                    | 37  | 249     | g248     | -3,353410082 | -0,634250667      | 0,189136029 | 0,644275363 |
| LINC00424                | 38  | 7517    | g7516    | -3,345147676 | -0,335782333      | 0,100378927 | 0,792354348 |
| NNMT1                    | 39  | 11143   | g11142   | -3,34169897  | -0,60755          | 0,181808716 | 0,656310309 |
| CIPC                     | 40  | 2902    | g2901    | -3,341466691 | -0,402215667      | 0,120370994 | 0,756695271 |
| CIC                      | 41  | 2898    | g2897    | -3,339989361 | -0,381143667      | 0,114115234 | 0,767828669 |
| LOC100507351             | 42  | 8352    | g8351    | -3,311454244 | -0,232046         | 0,070073745 | 0,85142656  |
| BC034456//RP11-229P13.25 | 43  | 1419    | g1418    | -3,306272285 | -0,373486333      | 0,112962969 | 0,771914876 |



**Figura 33.** Mapa de calor y clúster jerárquico. Contiene los 81 genes diferencialmente expresados en pacientes con la mutación en *FH* respecto a los controles sanos. Muestras representadas por las columnas, los pares de sondas de cada gen representadas por las filas. Dendograma de los genes a la izquierda, identificadores génicos a la derecha. Clúster jerárquico de las muestras arriba. Color rojo genes expresados a la alta, color azul genes expresados a la baja. Obtenido en software R. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

### 3.2.2.1 Anotación funcional de los genes diferencialmente expresados

## Caracterización individual de los genes

En las tablas 5 y 6, se aprecia la anotación funcional individual hecha con Genecards, de cada uno de los genes diferencialmente expresados. Pueden observarse los genes en forma de símbolo, con su nombre de acuerdo a sus siglas en inglés, con el respectivo número de identificación única para la base de datos del NCBI, conocido como Entrez ID; la ubicación cromosómica; los principales términos GO asociados en cuanto a proceso biológico; función molecular y componente celular; las vías más importantes relacionadas con el gen en particular, a partir de los datos arrojados por KEEG, Reactome, qiagen y/o

BioSystems; y una breve descripción de la función de su producto proteico. Si bien todos los genes utilizados para los análisis de anotación funcional son codificantes, de algunos no hay suficiente información e inclusive se desconoce su función.

**Tabla 5.** Anotación individual genes a la alta. Datos tomados de Genecards. (k): KEEG, (R) Reactome, (q) qiagen.

| Nombre  | Entrez ID | Ubicación | GO (BP)   | GO (MF)                        | GO (CC)               | Vías  | Función (Genecards)   |
|---|-----------|-----------|---|--------------------------------|-----------------------|---|---|
| <b>ERAP2</b><br>Endoplasmic Reticulum<br>Aminopeptidase 2           | 64167     | 5q15      | Respuesta inmune adaptativa   | Actividad aminopeptidasa       | Retículo endoplásmico | Sistema inmune (R)  | Civaje peptídico necesario para la generación de peptidasas de unión a moléculas HLA clase I.   |
| <b>CYTH3 *</b><br>Cytohesin 3                                       | 9265      | 7p22.1    | Regulación adhesión celular   | Actividad del factor ARF       | Citoplasma            | Endocitosis (K)   | Promueve la activación de factores ARF (ARF1, 6) , a través del reemplazo GDP-GTP   |
| <b>ACE *</b><br>Angiotensin I Converting<br>Enzyme                  | 1636      | 17q23.3   | Desarrollo de vasos sanguíneos y riñón.                               | Unión a actina                 | Región extracelular   | S. Renina angiotensina (K)<br>Cardiomiopatía hipertrófica (K) | Cataliza la conversión de angiotensina I en II.   |
| <b>CLEC12B *</b><br>C-Type Lectin Domain<br>Family 12, Member B     | 160364    | 12p13.2   | ---   | Unión a azúcares               | Membrana plasmática   | ---   | Receptor de superficie celular. Protege células diana de lisis mediada por NK.  |
| <b>VSTM2A</b><br>V-Set And<br>Transmembrane Domain<br>Containing 2A | 222008    | 7p11.2    | ---   | ---                            | Región extracelular   | ---   | ---   |
| <b>JDP2 *</b><br>Jun Dimerization Protein<br>2                      | 122953    | 14q24.3   | Regulación negativa desde el promotor de RNA polimerasa II.           | Unión a DNA                    | Núcleo                | Red factor de transcripción ATF2                              | Componente del factor de transcripción AP-1 que reprime la transactivación mediada por la familia de proteínas Jun.<br><b>Aumenta la unión de NRF2-Mafk al DNA.</b> |
| <b>CDKN2AIPNL</b><br>CDKN2A Interacting<br>Protein N-Terminal Like  | 91368     | 5q31.1    | ---   | ---                            | ---                   | ---   | ---   |
| <b>FKRP</b><br>Fukutin Related Protein                              | 79147     | 19q13.32  | Metabolismo de glicoproteínas   | Actividad transferasa          | Aparato de Golgi      | ---   | Involucrada en la modificación postraduccional del distroglicano en el aparato de Golgi.  |
| <b>FMNL3</b><br>Formin-Like 3                                       | 91010     | 12q13.12  | Organización de citoesqueleto   | Unión a actina                 | Citosol               | Señalización de GTPasas Rho.                                  | Regulación de la morfología celular y la organización de citoesqueleto  |
| <b>NPEPPS *</b><br>Aminopeptidase<br>Puromycin Sensitive            | 9520      | 17q21.32  | Proteólisis<br>Poliubiquitinación de proteínas<br>Respuesta a hipoxia | Actividad aminopeptidasa       | Citosol               | Sistema inmune (R)  | Metaloпротеinasa de zinc que hidroliza los aminoácidos del extremo N terminal de su sustrato.   |
| <b>NLRP4</b><br>NLR Family, Pyrin Domain<br>Containing 4            | 147945    | 19q13.43  | ---   | Unión a nucleótidos            | Citosol               | Sensores citosólicos de patógenos asociados a DNA (R)         | Activación de caspasas proinflamatorias.  |
| <b>CPLX2 *</b><br>Complexin 2                                       | 10814     | 5q35.2    | Transporte de neurotransmisores<br>Unión de vesículas exocitosis      | Unión SNARE<br>Unión sintaxina | Citosol               | Ciclo de vesículas sinápticas (K)                             | Regula negativamente el clustering de vesículas sinápticas. Regula positivamente la exocitosis de vesículas sinápticas.   |
| <b>SRL *</b><br>Sarcalumenin  | 6345      | 16p13.3   | ---   | Unión a calcio<br>Unión GTP    | Retículo endoplásmico | ---   | Probablemente relacionado con la regulación del transporte de calcio.   |
| <b>CTSO *</b><br>Cathepsin O  | 1519      | 4q32.1    | Proteólisis   | Actividad endopeptidasa        | Región extracelular   | Lisoma (K)<br>S. Inmune (R)                                   | Implicada en la degradación celular de proteínas  |
| <b>DDX11 *</b><br>DEAD/H Box Helicase 11                            | 1663      | 12p11.21  | Cohesión cromátides hermanas  | Unión a nucleótidos            | Núcleo                | Metabolismo de proteínas (R)                                  | Codifica para una DNA helicasa involucrada en proliferación celular.  |



**Tabla 5.** (Continuación) Anotación individual genes a la alta. Datos tomados de Genecards. (k): KEEG, (R) Reactome, (q) qiagen.

| Nombre   | Entrez ID | Ubicación   | GO (BP)   | GO (MF)                                  | GO (CC)  | Vías   | Función (Genecards)   |
|--|-----------|-------------|---|--|--|--|---|
| <b>NUDT4 *</b><br>Nudix Type Motif 4   | 11163     | 12q22       | Proceso metabólico<br>nucleótidos cíclicos<br>Señalización intracelular | Unión a proteínas<br>Unión a magnesio    | Citosol  | Metabolismo de inositol<br>fosfato (R)             | Regula la inactivación de los<br>polifosfatos difosfoinositoles, lo que<br>contribuye a la regulación del<br>transporte intracelular. |
| <b>SP110 *</b><br>SP110 Nuclear Body<br>Protein                                | 3431      | 2q37.1      | Transcripción   | Unión a DNA                              | Núcleo   | ---  | Puede tener un rol en la regulación en<br>la transcripción génica; en la<br>biogénesis del ribosoma.                                  |
| <b>TOP1MT *</b><br>Topoisomerase (DNA) I,<br>Mitochondrial                     | 116447    | 8q24.3      | Replicación del DNA   | Unión a DNA                              | Cromosoma<br>Mitocondria                           | ---  | Cataliza la rotura transitoria y la unión<br>del DNA, para aliviar la tensión del<br>superenrollamiento del genoma<br>mitocondrial.   |
| <b>SOGA1</b><br>Suppressor Of Glucose,<br>Autophagy Associated 1               | 140710    | 20q11.23    | Vía de señalización del<br>receptor de insulina                         | ---                                      | Región extracelular                                | ---  | Regula la autofagia; al jugar un rol<br>central en la reducción de glucosa<br>dependiente de insulina y<br>adiponectina.              |
| <b>FXR1 *</b><br>Fragile X Mental<br>Retardation, Autosomal<br>Homolog 1       | 8087      | 3q28        | Proceso apoptótico  | Unión a ácidos<br>nucleicos              | Núcleo   | Transporte de RNA (K)                              | Codifica para una proteína de unión a<br>RNA, que interactúa con proteínas<br>funcionalmente similares FMR1 y FXR2.                   |
| <b>SASH3 *</b><br>SAM And SH3 Domain<br>Containing 3                           | 54440     | Xq26        | Regulación de la producción<br>de citoquinas                            | Unión a proteínas                        | Núcleo   | ---  | Señalización celular. Linfocitos.   |
| <b>CLEC14A</b><br>C-Type Lectin Domain<br>Family 14, Member A                  | 161198    | 14q21.1     | ---   | Unión a azúcares                         | Integral a<br>membrana                             | ---  | Relacionada con adhesión celular,<br>angiogénesis, inflamación.   |
| <b>FAM118B *</b><br>Family With Sequence<br>Similarity 118, Member B           | 79607     | 11q24.2     | ---   | Unión a proteínas                        | Cuerpos de cajal                                   | ---  | Puede tener un rol en la formación de<br>los cuerpos de cajal.  |
| <b>SET</b><br>SET Nuclear Proto-<br>Oncogene                                   | 6418      | 9q34        | Proceso metabólico DNA<br>Replicación DNA                               | Inhibición de actividad<br>enzimática    | Nucleoplasma                                       | Ciclo celular-mitosis (R)                          | Codifica para una proteína que inhibe<br>la acetilación de nucleosomas  |
| <b>NAALAD2</b><br>N-Acetylated Alpha-<br>Linked Acidic<br>Dipeptidase 2        | 10003     | 11q14.3-q21 | Regulación de niveles de<br>neurotransmisores.                          | Actividad<br>carboxipeptidasa            | Componente de<br>membrana                          | Metabolismo de<br>aminoácidos (R)                  | Clivaje del neuropéptico N-acetil-L-<br>aspartato-L-glutamato (NAAG).   |
| <b>REEP3</b><br>Receptor Accessory<br>Protein 3                                | 221035    | 10q21.3     | Organización envoltura<br>nuclear<br>División núcleo mitosis            | ---                                      | Integral a<br>membrana<br>Reticulo<br>endoplasmico | ---  | Codifica para una proteína de unión a<br>microtúbulos requerida para asegurar<br>una adecuada división celular                        |
| <b>CTC1</b><br>CTS Telomere<br>Maintenance Complex<br>Component 1              | 80169     | 17p13.1     | Mantenimiento de los<br>telómeros                                       | Unión a DNA de hebra<br>simple           | Núcleo   | ---  | Codifica para un componente del<br>complejo CTS, el cual se encarga de<br>proteger los telómeros de la<br>degradación                 |
| <b>NALCN *</b><br>Sodium Leak Channel,<br>Non Selective                        | 259232    | 13q32.3     | Transporte de iones   | Actividad de canal<br>iónico             | Integral a<br>membrana                             | Transporte canal iónico<br>(R)                     | Codifica para una proteína que actúa<br>como un canal catiónico no selectivo,<br>independiente de voltaje.                            |
| <b>CREB5 *</b><br>cAMP Responsive<br>Element Binding Protein<br>5              | 9586      | 7p15.1      | Regulación transcripción  | Unión a DNA                              | Núcleo   | Cáncer de próstata (K)<br>Señalización PI3-AKT (K) | Se une al elemento de respuesta cAMP<br>activa la transcripción.  |
| <b>NFK</b><br>Nucleolar Protein<br>Interacting With The FHA<br>Domain Of MKI67 | 84365     | 2q14.3      | Ensamblaje de complejos<br>proteicos                                    | Unión a nucleótidos<br>Unión a proteínas | Núcleo   | ---  | Codifica una proteína que interactúa<br>con el antígeno Ki-67. Puede unirse al<br>RNA, rol en el ciclo celular y la mitosis           |

**Tabla 6.** Anotación individual genes a la baja. Datos tomados de Genecards. (k): KEEG, (R) Reactome, (q) qiagen.

| Nombre   | Entrez ID | Ubicación     | GO (BP)  | GO (MF)  | GO (CC)                                     | Vías  | Función- Genecards   |
|--|-----------|---------------|--|--|---|---|--|
| <b>ERBB2 *</b><br>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2                    | 2064      | 17q12         | Cascada MAPK<br>Morfogénesis celular                         | Unión a nucleótidos<br>Unión a glicoproteínas<br>Actividad protein quinasa | Membrana plasmática<br>Núcleo<br>Citoplasma | Señalización de ERBB2 (K)                             | Miembro de la familia de factores de transcripción tirosin quinasa del EGF. Crecimiento y estabilización de los microtúbulos |
| <b>PRSS36</b><br>Protease, Serine, 36                                  | 146547    | 16p11.2       | Proteólisis  | Actividad endopeptidasa  | Región extracelular                         | ---   | Serín proteasa. Hidroliza péptidos.  |
| <b>RTN2 *</b><br>Reticulon 2   | 6253      | 19q13.32      | Regulación de la importación de glucosa                      | Unión a proteínas  | Retículo endoplasmico                       | ---   | Codifica para una proteína necesaria para el adecuada generación del retículo endoplasmico tubular.                          |
| <b>KLRC4</b><br>Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily C, Member 4 | 8302      | 12p13.2-p12.3 | Respuesta de defensa celular                                 | ---  | Componente integral de membrana             | Procesamiento y presentación de antígenos (K)         | Receptor de reconocimiento de moléculas MHC clase I por células natural killer.  |
| <b>GUCA1A</b><br>Guanylate Cyclase Activator 1A                        | 2978      | 6p21.1        | Transducción de señales<br>Percepción visual                 | Unión a calcio   | Integral a membrana<br>Fotoreceptor         | Transducción visual (R)                               | Rol en la recuperación de los fotoreceptores de retina luego de la fluorescencia.  |
| <b>ZNF740</b><br>Zinc Finger Protein 740                               | 283337    | 12q13.13      | Regulación de la traducción                                  | Unión a iones metales  | Núcleo                                      | Expresión génica (R)                                  | Regulación de la transcripción.  |
| <b>CCl8 *</b><br>Chemokine (C-C Motif) Ligand 8                        | 6355      | 17q11.2       | Transporte de iones<br>Quimiotaxis                           | Actividad quemoquina<br>Actividad citoquina                                | Región extracelular                         | Señalización quemoquinas (K)                          | Codifica para una proteína con actividad quemoquinética para monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos.                 |
| <b>TRIM33 *</b><br>Tripartite Motif Containing 33                      | 51592     | 1p13.1        | Transcripción  | Unión a DNA  | Núcleo                                      | Vía genérica transcripción (R)                        | Se cree que actúa como un corepresor transcripcional. Promueve la degradación de SMD4.                                       |
| <b>FOXA3</b><br>Forkhead Box A3  | 3171      | 19q13.32      | Homeostasis glucosa celular                                  | Unión a DNA  | Núcleo                                      | Diabetes del joven (K)<br>Desarrollo células beta (R) | Factor de transcripción que activa transcritos hígado específicos como la albumina.  |
| <b>MC1R *</b><br>Melanocortin 1 Receptor                               | 4157      | 16q24.3       | Vía de señalización de receptores acoplados a proteínas G    | Actividad receptor acoplado a proteína G                                   | Membrana plasmática                         | Melanogénesis (K)                                     | Controla la melanogénesis. Estimula la síntesis de eumelanina.   |
| <b>MED1</b><br>Mediator Complex Subunit 1                              | 5469      | 17q12         | Morfogénesis celular   | Unión a DNA<br>Actividad factor transcripción RNA polimerasa II            | Núcleo                                      | Biología del desarrollo (R)                           | Coactivador involucrado en la regulación de la transcripción de genes dependientes de RNA polimerasa II.                     |
| <b>IRAK3 *</b><br>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3           | 11213     | 12q14.3       | Regulación negativa de producción de citoquinas.             | Unión a nucleótidos<br>Unión a magnesio                                    | Núcleo                                      | Apoptosis (K)<br>Señalización citoquinas (R)          | Transducción de señales mediada por Toll/IL-R. Se expresa en monocitos y macrófagos.   |
| <b>CYB561A3</b><br>Cytochrome B561 Family, Member A3                   | 220002    | 11q12.2       | Proceso oxidación reducción                                  | Unión a proteínas<br>Unión a iones metales                                 | Lisosoma                                    | ---   | Reduce el hierro ferroso a férrico antes del transporte del endosoma al citoplasma.  |
| <b>CPSF2</b><br>Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 2         | 53981     | 14q31.1       | Splicing de RNA  | Unión a RNA  | Nucleoplasma                                | Vía del mRNA (K)                                      | Rol en la formación del extremo 3' del pre-mRNA.   |
| <b>SEMA4D *</b><br>Semaphorin 4D                                       | 10507     | 9q22.2        | Respuesta inmune<br>Adhesión celular                         | Actividad receptor   | Membrana plasmática                         | Guía de los axones (K)                                | Señalización célula- célula. Promueve la reorganización del citoesqueleto. Morfogénesis de los axones.                       |
| <b>RAP1GAP2 *</b><br>RAP1 GTPase Activating Protein 2                  | 23108     | 17p13.3       | Regulación del tamaño celular<br>Regulación actividad GTPasa | Activador de actividad GTPasa  | Citosol                                     | Sistema inmune (R)                                    | Activa en las plaquetas a la proteína RAP-1 que se une a nucleótidos de guanina.   |
| <b>ZNF266 *</b><br>Zinc Finger Protein 266                             | 10781     | 19p13.2       | Transcripción  | Unión a DNA  | Núcleo                                      | Expresión génica (R)                                  | Contiene varios motivos de dedos de zinc, los cuales le permitirían funciones de regulación de la transcripción.             |



**Tabla 6.** (Continuación) Anotación individual genes a la baja. Datos tomados de Genecards. (k): KEEG, (R) Reactome, (q) qiagen.

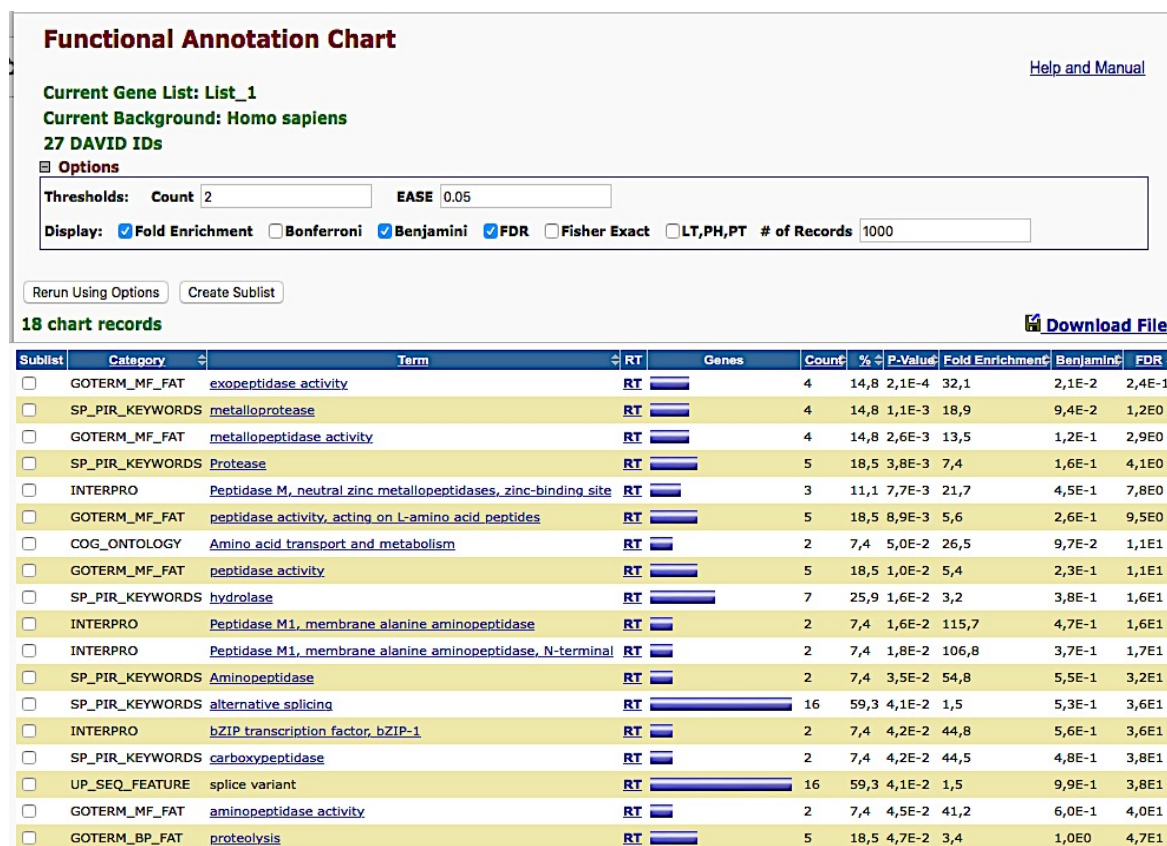
| Nombre   | Entrez ID | Ubicación     | GO (BP)   | GO (MF)   | GO (CC)                            | Vías   | Función- Genecards  |
|--|-----------|---------------|---|---|------------------------------------|--|---|
| <b>PAMR1</b><br>Peptidase Domain<br>Containing Associated<br>With Muscle<br>Regeneration 1           | 25891     | 11p13         | Proteólisis   | Actividad Endopeptidasa<br>tipo serina                              | Región<br>extracelular             | ---  | Rol en regeneración del musculo<br>esquelético.   |
| <b>LPIN3</b><br>Lipin 3  | 64900     | 20q11.2-q12   | Desfosforilación<br>proteínas                                     | Actividad coactivador<br>transcripción                              | Núcleo<br>Retículo<br>endoplasmico | Metabolismo de<br>glicerofosfolípidos y<br>glicerolípidos (K)            | Regula metabolismo de ácidos grasos.  |
| <b>NNMT *</b><br>Nicotinamide N-<br>Methyltransferase  | 4837      | 11q23.1       | Proceso metabólico<br>xenobiótico                                 | Actividad nicotinamida N-<br>metiltransferasa                       | Citosol                            | Oxidaciones biológicas (R)<br>Metabolismo de<br>nicotinamida (K)         | Codifica una proteína con actividad<br>catalítica que usa S-adenosil metionina<br>como un donador metilo, proceso<br>necesario en la detoxificación   |
| <b>PRR30</b><br>Proline Rich 30  | 339779    | 2p23.3        | ---   | ---   | ---                                | ---  | ---   |
| <b>IKZF3 *</b><br>IKAROS Family Zinc Finger<br>3   | 22806     | 17q21         | Regulación de la<br>transcripción                                 | Unión a DNA   | Núcleo                             | Señalización mediada por<br>IL-2, (Biosystems)                           | Involucrado en la regulación del<br>desarrollo de linfocitos, así como<br>proliferación y diferenciación de<br>linfocitos B.  |
| <b>ZNF37A</b><br>Zinc Finger Protein 37A   | 7587      | 12q13.13      | Transcripción   | Unión a ácidos nucleicos  | Núcleo                             | Expresión génica (R)   | Regulación de la transcripción  |
| <b>HPX</b><br>Hemopexin  | 3263      | 11p15.5-p15.4 | Regulación positiva de<br>la producción de Igs                    | Unión a proteínas<br>Unión a iones metales                          | Región<br>extracelular             | Transporte mediado por<br>vesículas (R)                                  | Codifica para una proteína que se une<br>al grupo heme y lo transporta al<br>hígado.  |
| <b>MYO3B *</b><br>Myosin IIIB  | 140469    | 2q31.1-q31.2  | Fosforilación de<br>aminoácidos                                   | Actividad motora de<br>microfilamentos<br>Actividad protein quinasa | Citoesqueleto<br>Fotoreceptor      | Vía PAK (q)<br>Vía Rho GDI (q)   | Codifica para una proteína ATPasa,<br>activada por actina la cual se mueve<br>a lo largo de los filamentos de actina.   |
| <b>PGAM5 *</b><br>PGAM Family Member 5,<br>Serine/Threonine Protein<br>Phosphatase,<br>Mitochondrial | 192111    | 12q24.33      | Desfosforilación de<br>proteínas                                  | Actividad activador<br>GTPasa                                       | Mitocondria                        | Señalización TNF   | Codifica para una proteína con<br>actividad fosfatasa para residuos serin/<br>treonina.<br><b>Substrato de KEAP1.</b><br><b>Contribuye a la represión de la</b><br><b>expresión mediada por NRF2.</b> |
| <b>STAT2</b><br>Signal Transducer And<br>Activator Of Transcription<br>2                             | 6773      | 12q13.3       | Transcripción<br>Regulación positiva de<br>defensa a virus        | Unión a DNA   | Núcleo                             | Señalización de<br>quemoquinas (K)<br>Vía JAK/SAT (K)                    | Transducción de señales y activador<br>de la transcripción mediada por INF<br>alfa y beta.  |
| <b>ZNF609</b><br>Zinc Finger Protein 609   | 23060     | 15q22.1       | ---   | Unión a iones metales   | Núcleo                             | ---  | ---   |
| <b>ACOT6</b><br>Acyl-CoA Thioesterase 6  | 641372    | 14q24.3       | Proceso metabólico  | Actividad carboxil-ester  | Citosol                            | Metabolismo lípidos y<br>lipoproteínas                                   | ---   |
| <b>NMT1</b><br>N-Myristoyltransferase<br>1   | 4836      |               | Desarrollo embrionario in<br>útero<br>Mistilación de<br>proteínas | Actividad N-<br>tetradecanoiltransferasa<br>Glicopéptido            | Citosol                            | Transducción de señales (R)<br>Fototransducción (R)<br>Infección VIH (R) | Reacción de N-mistilización   |
| <b>CIPC</b><br>CLOCK-Interacting<br>Pacemaker  | 85457     | 14q24.3       | Transcripción   | Unión a proteínas   | Núcleo                             | ---  | Represor transcripcional relevante en el<br>mecanismo de reloj circadiano.  |
| <b>CIC *</b><br>Capicua Transcriptional<br>Repressor   | 23152     | 9q13.2        | Transcripción   | Unión a DNA   | Núcleo                             | ---  | Represor de la transcripción  |

### 3.2.2.2 Análisis de enriquecimiento de anotación génica

#### Enriquecimiento singular

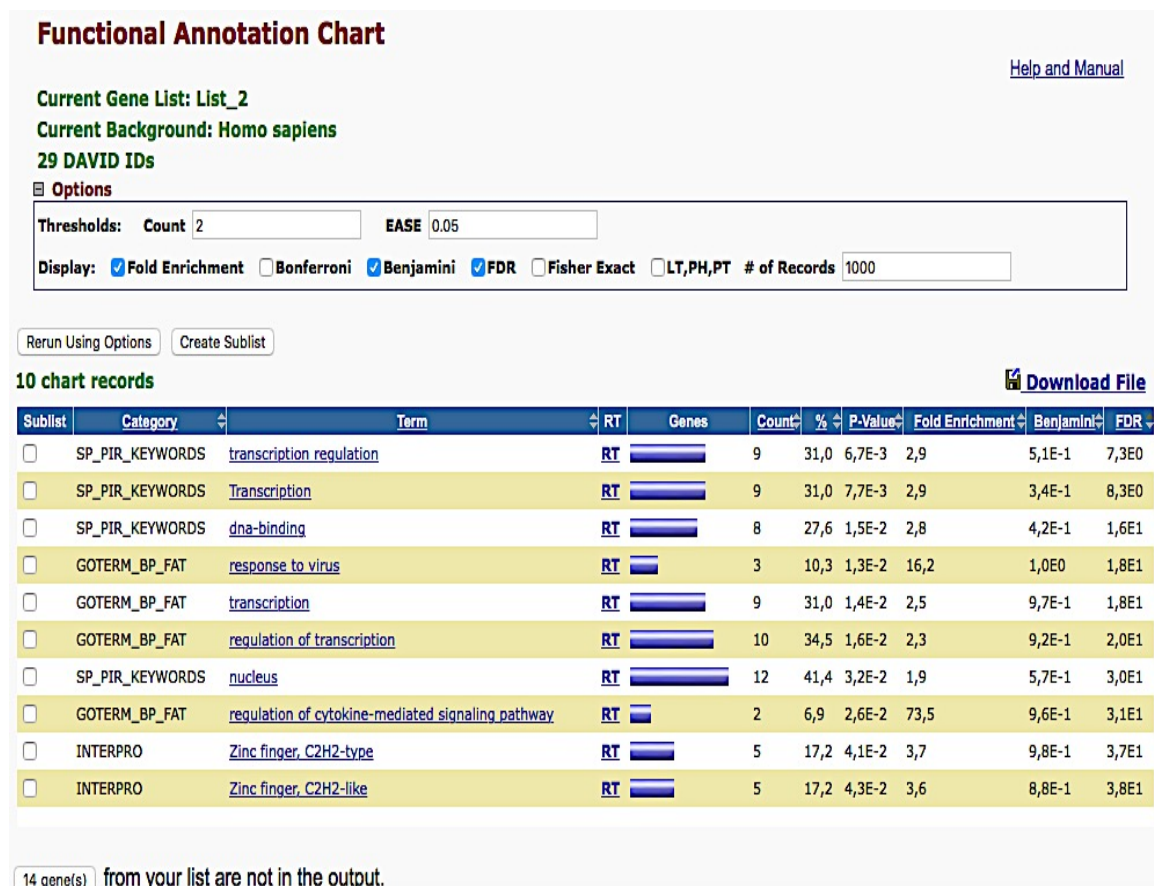
De forma separada se subió la lista de genes a la alta y a la baja al módulo de análisis de DAVID, donde se realizó el enriquecimiento singular, por intermedio de la herramienta Tabla de análisis funcional (Functional annotation chart). El número mínimo de genes para cada término se determinó como 2. El punto de corte para que los datos fuesen declarados como significativos de acuerdo con el puntaje EASE, se fijó a  $< 0.05$ , lo que sugiere que los términos que resultaron enriquecidos, lo hacen por algo más que el simple azar [87]. En cuanto, al nivel de enriquecimiento (Fold enrichment) de acuerdo con las recomendaciones Huang et al [87], este se tomó como interesante cuando superó el 1.5. Por otro lado, aunque se calculó la FDR, los p-valores luego de esta corrección no fueron en su mayoría significativos, por lo que no fueron tenidos en cuenta y se asumió que la combinación de puntajes EASE  $< 0.05$  y niveles de enriquecimiento mayores a 1.5, resultaban suficientes para declarar a los enriquecimientos como biológicamente significativos, tal como lo sugiere el mismo artículo de Huang et al [87], donde se insta a preponderar el criterio del usuario frente a la interpretación de las pruebas de múltiple corrección conservadoras.

En el caso de los genes a la alta (Figura 34), los principales términos enriquecidos fueron aquellos asociados con actividades enzimáticas (actividad exopeptidasa, metaloproteasa, metalopeptidasa, proteasa, hidrolasa, entre otros). Este enriquecimiento singular, no presentó términos de componente celular, enfermedades asociadas, ni de vías biológicas, pero sí hubo enriquecimiento de términos de InterPro.



**Figura 34.** Resultados Tabla de anotación funcional DAVID, genes a la alta.

Respecto a los genes a la baja (Figura 35), los términos enriquecidos en su mayoría incluyeron procesos biológicos, componente celulares y dominios proteicos relativos a transcripción (regulación de la transcripción, unión a DNA, núcleo, dedos de zinc).



**Figura 35.** Resultados Tabla de anotación funcional DAVID, genes a la baja.

Entre la lista de genes a la alta y a la baja, no se compartió ningún termino enriquecido con esta metodología.

## Enriquecimiento modular

La listas de genes a la alta y a la baja se sometieron a enriquecimiento modular con Genecodis. En cada caso, se seleccionaron las siguientes anotaciones: proceso biológico GO, función molecular GO, componente celular GO, vías KEEG, vías PANTHER, motivos proteicos InterPro y factores de transcripción. Se dejaron los parámetros estadísticos brindados por la herramienta, por defecto: número mínimo de genes: 3, prueba estadística: análisis hipergeométrico, corrección de p-valor: FDR. De igual forma que en DAVID, la lista de referencia fueron todos los genes con anotación conocida para los términos seleccionados.

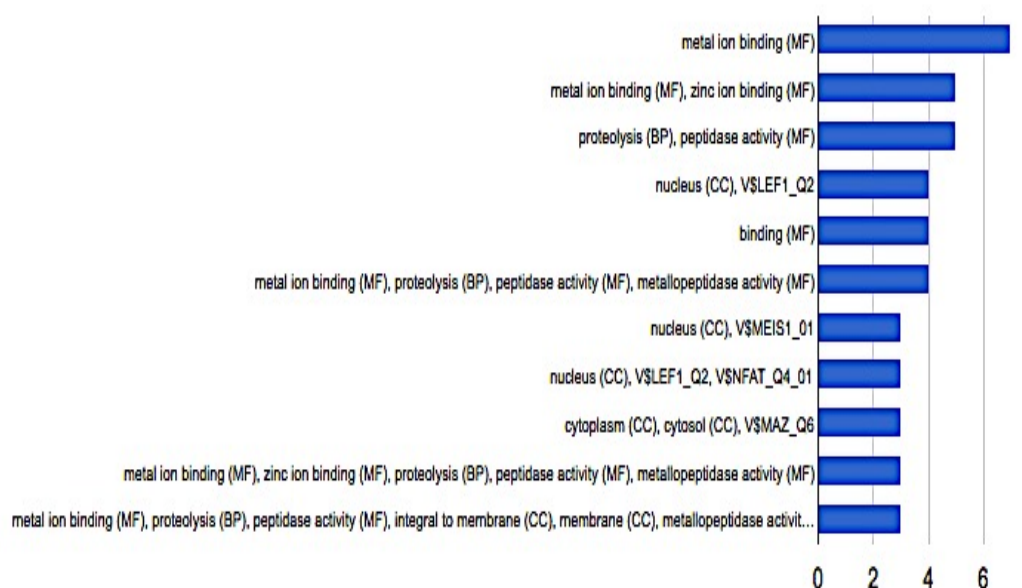
El enriquecimiento modular de los genes expresados a la alta (Figura 36 y 37) estuvo compuesto de anotaciones estadísticamente significativas, inclusive luego de la corrección por FDR. Dentro de estas, se destaca la función molecular, unión a metales , que junto con los términos actividad peptidasa, metaloproteasa y proteólisis, fueron los más comúnmente encontrados en los grupos de co-ocurrencias.

### Modular and Singular Enrichment Analysis Results

Organism: Homo sapiens  
 Annotations selected: GO Biological Process, GO Molecular Function, GO Cellular Component, KEGG Pathways, InterPro Motifs, Panther Pathways, Transcription Factors  
 Summary of the user provided list of genes - (zipped)  
 Following genes do not show annotations in the selected categories:  
 — 2 Genes (6.45%)  
 SOGA1, NIFK

| Genes   | NGR  | TNGR  | NG | TNG | Hyp         | Hyp*        | Annotations   |
|---------|------|-------|----|-----|-------------|-------------|---|
| 3 genes | 12   | 34208 | 3  | 29  | 1.19886e-07 | 3.59658e-06 | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0006508: proteolysis (BP)<br>GO:0008233: peptidase activity (MF)<br>GO:0016021: integral to membrane (CC)<br>GO:0016020: membrane (CC)<br>GO:0008237: metallopeptidase activity (MF) |
| 4 genes | 79   | 34208 | 4  | 29  | 5.98718e-07 | 8.98077e-06 | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0006508: proteolysis (BP)<br>GO:0008233: peptidase activity (MF)<br>GO:0008237: metallopeptidase activity (MF)   |
| 3 genes | 59   | 34208 | 3  | 29  | 1.72471e-05 | 0.000172471 | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0006508: proteolysis (BP)<br>GO:0008233: peptidase activity (MF)<br>GO:0008237: metallopeptidase activity (MF)                                  |
| 5 genes | 461  | 34208 | 5  | 29  | 3.95503e-05 | 0.000296627 | GO:0006508: proteolysis (BP)<br>GO:0008233: peptidase activity (MF)   |
| 3 genes | 193  | 34208 | 3  | 29  | 0.000579866 | 0.0034792   | GO:0005737: cytoplasm (CC)<br>GO:0005829: cytosol (CC)<br>(Transcription factor) VSMAZ_Q6   |
| 3 genes | 243  | 34208 | 3  | 29  | 0.00112858  | 0.00564291  | GO:0005634: nucleus (CC)<br>(Transcription factor) VSLEF1_Q2<br>(Transcription factor) VSNFAT_Q4_Q1   |
| 3 genes | 286  | 34208 | 3  | 29  | 0.00179894  | 0.00770976  | GO:0005634: nucleus (CC)<br>(Transcription factor) VSMEIS1_Q1   |
| 4 genes | 731  | 34208 | 4  | 29  | 0.00321188  | 0.0120446   | GO:0005488: binding (MF)  |
| 4 genes | 769  | 34208 | 4  | 29  | 0.00384887  | 0.0128296   | GO:0005634: nucleus (CC)<br>(Transcription factor) VSLEF1_Q2  |
| 7 genes | 2879 | 34208 | 7  | 29  | 0.0088682   | 0.0266046   | GO:0046872: metal ion binding (MF)  |
| 5 genes | 1809 | 34208 | 5  | 29  | 0.0169058   | 0.0461066   | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)   |

**Figura 36.** Enriquecimiento modular genes expresados a la alta. De izquierda a derecha: columna con número de genes, NGR: número de genes anotados en la lista de referencia, TNGR: número total de genes en la lista de referencia, NG: número de genes anotados en la lista sometida, TNG: número total de genes en la lista sometida. Hyp: p-valor hiper-geométrico, Hyp\*: p-valor hiper-geométrico corregido. Anotaciones en cada grupo de co-ocurrencias.



**Figura 37.** Grafica de barras enriquecimiento modular. Se resumen los principales hallazgos del enriquecimiento modular genes expresados a la alta. Eje x número de genes por anotación, Eje y anotaciones.

Por su parte, el enriquecimiento modular hecho en la lista de genes expresados a la baja (Figuras 38, 39 y 40), fue mucho más rico, también con anotaciones estadísticamente significativas y mostrando una clara tendencia en los grupos de co-ocurrencias, términos asociados a transcripción (núcleo, unión a DNA), funciones moleculares de unión a proteínas y ATP y procesos biológicos de transducción de señales y fosforilación proteica.



## Modular and Singular Enrichment Analysis Results

Organism: Homo sapiens

Annotations selected: GO Biological Process, GO Molecular Function, GO Cellular Component, KEGG Pathways, InterPro Motifs, MicroRNA, Panther Pathways, Transcription Factors

Summary of the user provided list of genes - (zipped)

Following genes do not show annotations in the selected categories:

— 4 Genes (12.12%)

KLRC4-, CYB561A3, PRR30, CIPC

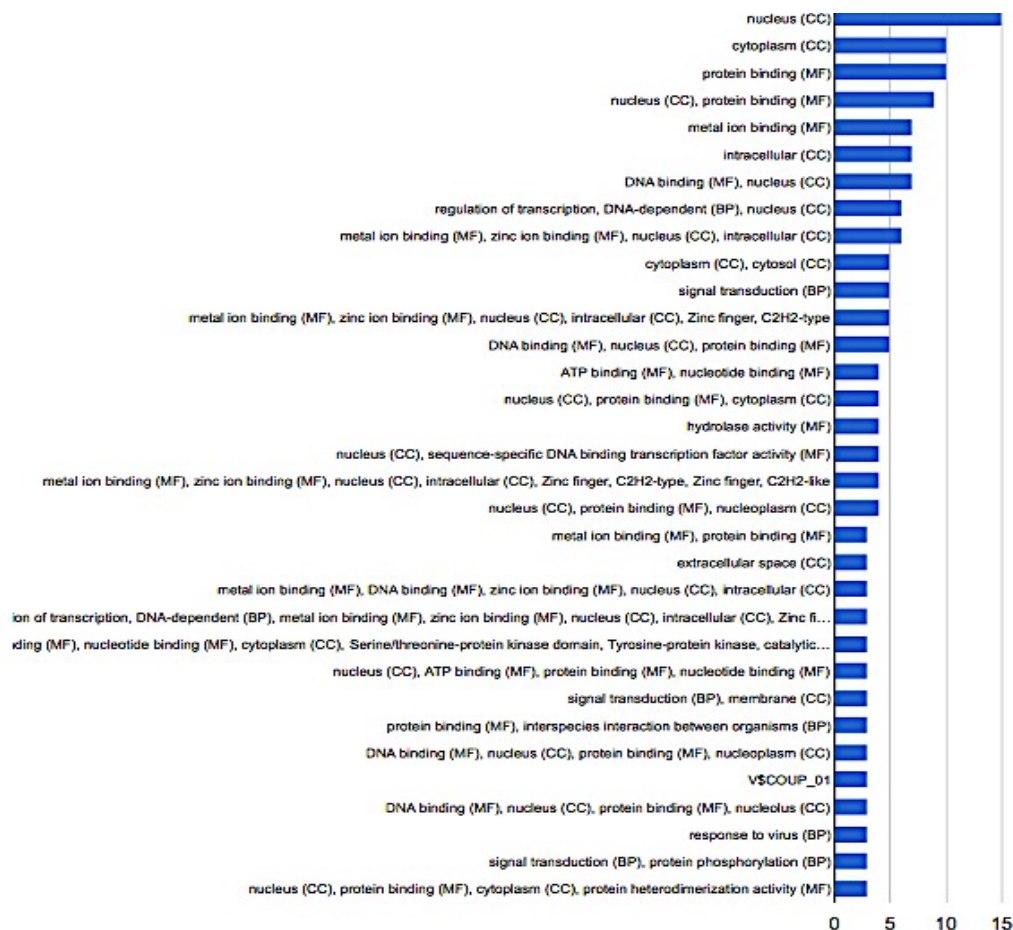
| Genes    | NGR  | TNGR  | NG | TNG | Hyp         | Hyp*        | Annotations   |
|----------|------|-------|----|-----|-------------|-------------|---|
| 15 genes | 5441 | 34208 | 15 | 29  | 8.53905e-06 | 0.000375718 | GO:0005634: nucleus (CC)  |
| 3 genes  | 60   | 34208 | 3  | 29  | 1.81445e-05 | 0.000399178 | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005737: cytoplasm (CC)<br>GO:0046982: protein heterodimerization activity (MF)                                    |
| 3 genes  | 102  | 34208 | 3  | 29  | 8.88884e-05 | 0.000651848 | GO:0007165: signal transduction (BP)<br>GO:0006468: protein phosphorylation (BP)  |
| 9 genes  | 2218 | 34208 | 9  | 29  | 6.0753e-05  | 0.000668283 | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)  |
| 6 genes  | 806  | 34208 | 6  | 29  | 5.01966e-05 | 0.000736216 | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005622: intracellular (CC)   |
| 5 genes  | 542  | 34208 | 5  | 29  | 8.49972e-05 | 0.000747975 | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)  |
| 5 genes  | 695  | 34208 | 5  | 29  | 0.000270435 | 0.00148739  | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005622: intracellular (CC)<br>(InterPro) IPR007087: Zinc finger, C2H2-type |
| 3 genes  | 144  | 34208 | 3  | 29  | 0.000246336 | 0.0015484   | GO:0009615: response to virus (BP)  |
| 3 genes  | 177  | 34208 | 3  | 29  | 0.000450725 | 0.00198319  | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005730: nucleolus (CC)  |
| 7 genes  | 1690 | 34208 | 7  | 29  | 0.000423919 | 0.00207249  | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)  |
| 3 genes  | 187  | 34208 | 3  | 29  | 0.000528986 | 0.00211594  | (Transcription factor) VSCOUP_01  |
| 3 genes  | 210  | 34208 | 3  | 29  | 0.000740743 | 0.00271606  | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005654: nucleoplasm (CC)  |

**Figura 38.** Enriquecimiento modular genes expresados a la baja. De izquierda a derecha: columna con número de genes, NGR: número de genes anotados en la lista de referencia, TNGR: número total de genes en la lista de referencia, NG: número de genes anotados en la lista sometida, TNG: número total de genes en la lista sometida. Hyp: p-valor hiper-geométrico, Hyp\*: p-valor hiper-geométrico corregido. Anotaciones en cada grupo de co-ocurrencias.

|          |      |       |    |    |             |            |  |
|----------|------|-------|----|----|-------------|------------|--|
| 7 genes  | 1690 | 34208 | 7  | 29 | 0.000423919 | 0.00207249 | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)   |
| 3 genes  | 187  | 34208 | 3  | 29 | 0.000528986 | 0.00211594 | (Transcription factor) VSCOU_P_01  |
| 3 genes  | 210  | 34208 | 3  | 29 | 0.000740743 | 0.00271606 | GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005654: nucleoplasm (CC)   |
| 7 genes  | 1962 | 34208 | 7  | 29 | 0.001031    | 0.0032403  | GO:0005622: intracellular (CC)   |
| 3 genes  | 232  | 34208 | 3  | 29 | 0.000987726 | 0.00334307 | GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0044419: interspecies interaction between organisms (BP)  |
| 6 genes  | 1503 | 34208 | 6  | 29 | 0.00141627  | 0.00366565 | GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent (BP)<br>GO:0005634: nucleus (CC)  |
| 3 genes  | 262  | 34208 | 3  | 29 | 0.00140063  | 0.00385172 | GO:0007165: signal transduction (BP)<br>GO:0016020: membrane (CC)  |
| 4 genes  | 575  | 34208 | 4  | 29 | 0.00134392  | 0.00394217 | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005654: nucleoplasm (CC)   |
| 3 genes  | 290  | 34208 | 3  | 29 | 0.0018715   | 0.00457479 | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005524: ATP binding (MF)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0000166: nucleotide binding (MF)  |
| 3 genes  | 296  | 34208 | 3  | 29 | 0.00198374  | 0.00459392 | GO:0005524: ATP binding (MF)<br>GO:0000166: nucleotide binding (MF)<br>GO:0005737: cytoplasm (CC)<br>(InterPro) IPR002290: Serine/threonine-protein kinase domain<br>(InterPro) IPR020635: Tyrosine-protein kinase, catalytic domain<br>(InterPro) IPR000719: Protein kinase, catalytic domain       |
| 4 genes  | 681  | 34208 | 4  | 29 | 0.00248943  | 0.00547675 | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005622: intracellular (CC)<br>(InterPro) IPR007087: Zinc finger, C2H2-type<br>(InterPro) IPR015880: Zinc finger, C2H2-like  |
| 10 genes | 4463 | 34208 | 10 | 29 | 0.00266325  | 0.00558014 | GO:0005515: protein binding (MF)   |
| 5 genes  | 1176 | 34208 | 5  | 29 | 0.00284299  | 0.00568599 | GO:0007165: signal transduction (BP)   |
| 4 genes  | 877  | 34208 | 4  | 29 | 0.0061187   | 0.0117053  | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0003700: sequence-specific DNA binding transcription factor activity (MF)   |
| 7 genes  | 2879 | 34208 | 7  | 29 | 0.0088682   | 0.0150077  | GO:0046872: metal ion binding (MF)   |
| 10 genes | 5302 | 34208 | 10 | 29 | 0.00931576  | 0.0151812  | GO:0005737: cytoplasm (CC)   |
| 4 genes  | 971  | 34208 | 4  | 29 | 0.00870967  | 0.015329   | GO:0016787: hydrolase activity (MF)  |
| 5 genes  | 1532 | 34208 | 5  | 29 | 0.0086639   | 0.0158838  | GO:0005737: cytoplasm (CC)<br>GO:0005829: cytosol (CC)   |
| 3 genes  | 554  | 34208 | 3  | 29 | 0.0112913   | 0.0177435  | GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent (BP)<br>GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005622: intracellular (CC)<br>(InterPro) IPR007087: Zinc finger, C2H2-type<br>(InterPro) IPR015880: Zinc finger, C2H2-like |
| 3 genes  | 666  | 34208 | 3  | 29 | 0.0184326   | 0.0279667  | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0003677: DNA binding (MF)<br>GO:0008270: zinc ion binding (MF)<br>GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005622: intracellular (CC)  |
| 4 genes  | 1314 | 34208 | 4  | 29 | 0.0239544   | 0.0351332  | GO:0005634: nucleus (CC)<br>GO:0005515: protein binding (MF)<br>GO:0005737: cytoplasm (CC)   |
| 4 genes  | 1367 | 34208 | 4  | 29 | 0.0272119   | 0.0374163  | GO:0005524: ATP binding (MF)<br>GO:0000166: nucleotide binding (MF)  |
| 3 genes  | 784  | 34208 | 3  | 29 | 0.0281551   | 0.0375401  | GO:0005615: extracellular space (CC)   |
| 3 genes  | 768  | 34208 | 3  | 29 | 0.0267033   | 0.0379014  | GO:0046872: metal ion binding (MF)<br>GO:0005515: protein binding (MF)   |

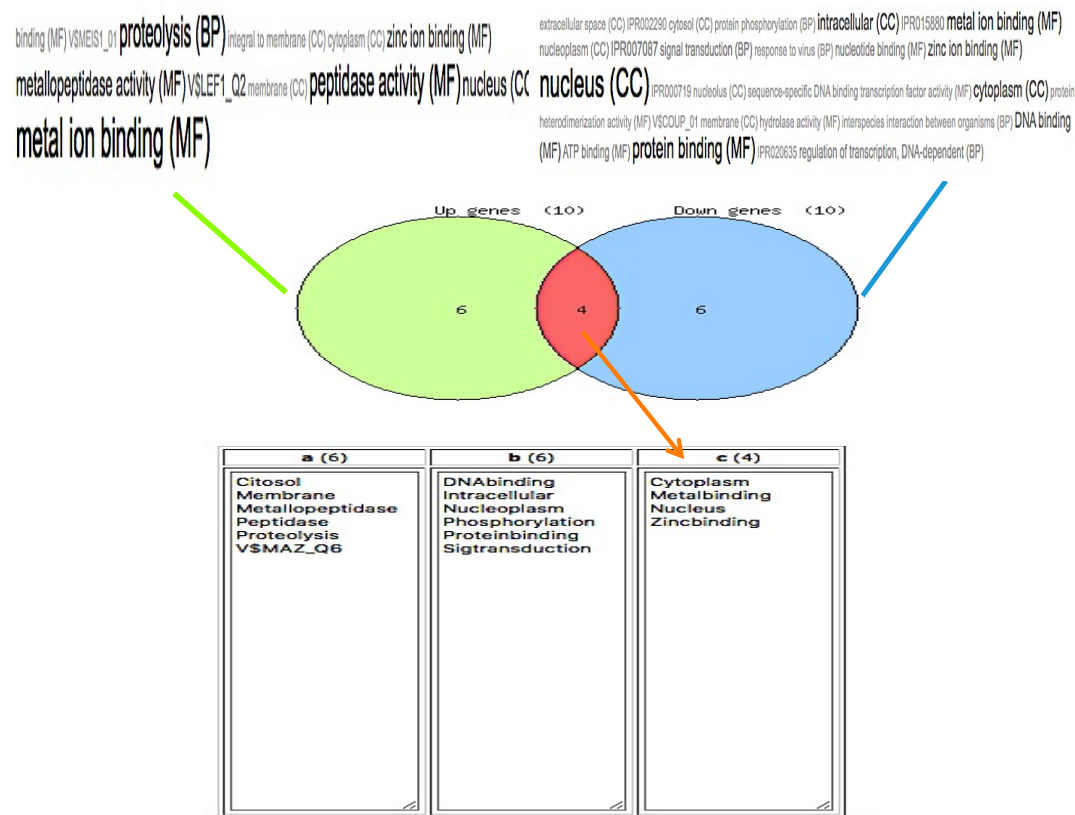
**Figura 38.** (Continuación) Enriquecimiento modular genes expresados a la baja. De izquierda a derecha: columna con número de genes, NGR: número de genes anotados en la lista de referencia, TNGR: número total de genes en la lista de referencia, NG: número de genes anotados en la lista sometida, TNG: número total de genes en la lista sometida. Hyp: p-valor hiper-geométrico, Hyp\*: p-valor hiper-geométrico corregido. Anotaciones en cada grupo de co-ocurrencias.





**Figura 39.** Grafica de barras enriquecimiento modular. Se resumen los principales hallazgos del enriquecimiento modular genes expresados a la baja. Eje x número de genes por anotación, Eje y anotaciones.

Quedó clara, la presencia de términos muy similares a los encontrados por DAVID, y al observar simultáneamente ambos enriquecimientos modulares, de los genes a la alta y a la baja, se advirtió además que existían anotaciones compartidas en cuanto a: función molecular: unión a metales, unión a zinc y componente celular: citoplasma, núcleo (Figura 40).



**Figura 40.** Diagrama de Venn para enriquecimiento modular. hecho con 10 anotaciones por grupo (genes a la alta- sombreado verde, genes a la baja-sombreado azul), donde se observa en el rojo los términos compartidos. Obtenido con Venn diagram generator: <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>. Arriba gráfica tipo tag cloud, proporcionada por Genecodis para cada enriquecimiento modular.

### 3.2.2.3 Red de interacción genes diferencialmente expresados

Usando los parámetros por defecto de GeneMANIA se construyeron las redes de interacción para los genes expresados a la alta y a la baja. En la casilla de número de genes relacionados en el resultado se determinó a 50. Los atributos que se evaluaron fueron: co-expresión, co-localización, interacciones genéticas, vías consolidadas, interacciones físicas y dominios proteicos compartidos; cada uno está representado por un color diferente en la gráfica de la red, donde además puede advertirse el porcentaje que aporta un atributo específico, para la creación de la red. (Figuras 42 y 43).

En ambas redes (genes a la alta y a la baja), el atributo con el mayor porcentaje fue co – expresión. Los genes a la alta tienen un 21.48% de interacciones genéticas frente a un 0.29% de los genes a la baja, que tampoco presentaron dominios proteicos compartidos,

como si lo hicieron los genes expresados a la alta 18.29%. Las vías consolidadas para los dos redes, mostraron algunas de las ya descritas en la anotación funcional individual, en los genes a la alta: respuesta inmune, respuesta inmune adaptativa, metabolismo de proteínas; y en los genes a la baja: señalización de quemoquinas, guía de axones, señalización de semaforinas y migración celular.

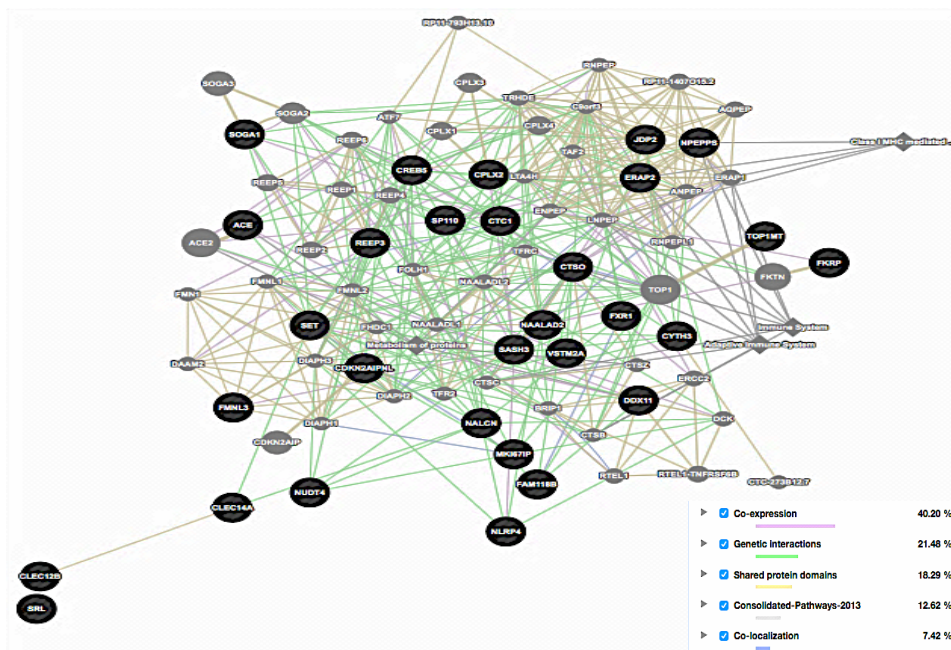


Figura 41. Red obtenida con GeneMANIA.org para genes expresados a la alta.

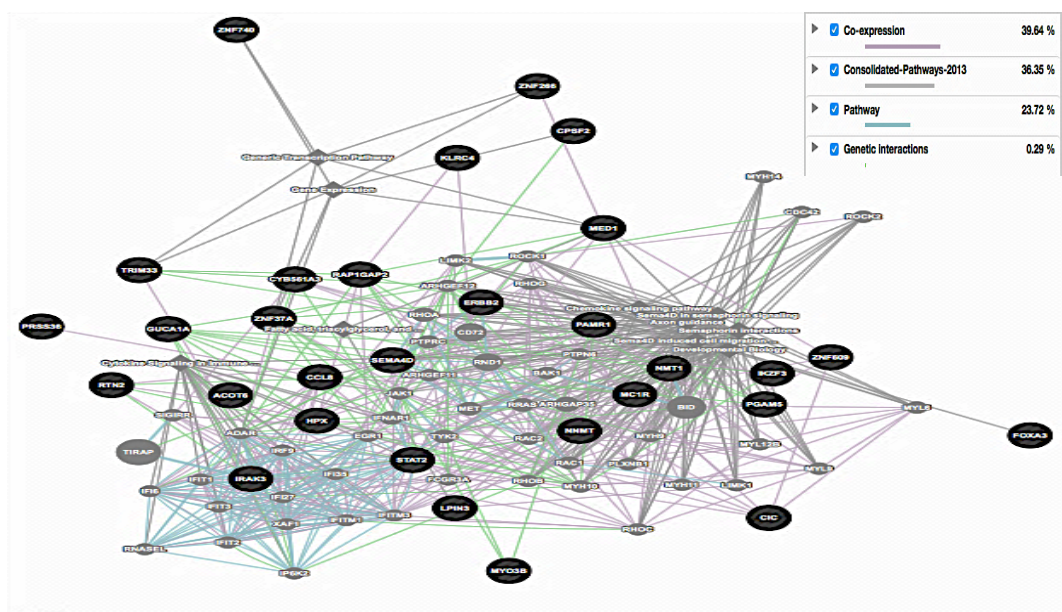


Figura 42. Red obtenida con GeneMANIA.org para genes expresados a la baja.

### 3.2.2.4 Blancos de NRF2 identificados en la lista de genes diferencialmente expresados

Se descargaron los materiales suplementarios, que contenían datos de blancos y genes relacionados con NRF2 de los artículos de Chorley et al [95] y Papp, Korcsmáros et al (2012) [96]; además se descargó toda la base de datos de la pagina NRF2ome en formato csv, y en cada una de las matrices se buscó por los genes incluidos en la lista de diferencialmente expresados. Fue la información de NRF2ome, la que resultó más completa y con la que se pudo edificar las tablas 7, 8 y 9, donde se resumen la información de los genes expresados a la alta y expresados a la baja en este estudio, que resultaron ser asociados con NRF2.

**Tabla 7.** Blancos de *NRF2* encontrados en genes a la alta.

| Gen  | Entrez ID | Función   | Etiqueta                       | Tipo de interacción     | Direccionalidad | Efecto      | Ref                       |
|--|-----------|---|--------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------|---------------------------|
| <b>CYTH3 *</b><br>Cytohesin 3                                | 9265      | Promueve la activación de factores ARF (ARF1, 6) , a través del reemplazo GDP-GTP                                       | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>ACE *</b><br>Angiotensin I Converting Enzyme              | 1636      | Cataliza la conversión de angiotensina I en II  | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>CLEC12B *</b><br>C-Type Lectin Domain Family 12, Member B | 160364    | Receptor de superficie celular. Protege células diana de lisis mediada por NK.  | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>NPEPPS *</b><br>Aminopeptidase Puromycin Sensitive        | 9520      | Metaloproteinasa de zinc que hidroliza los aminoácidos del extremo N terminal de su sustrato.                           | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>CPLX2 *</b><br>Complexin 2                                | 10814     | Regula negativamente el clustering de vesículas sinápticas. Regula positivamente la exocitosis de vesículas sinápticas. | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>SRL *</b><br>Sarcalumenin                                 | 6345      | Probablemente relacionado con la regulación del transporte de calcio.   | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>CTSO *</b><br>Cathepsin O                                 | 1519      | Implicada en la degradación celular de proteínas  | Regulación transcripcional     | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al |
| <b>DDX11 *</b><br>DEAD/H Box Helicase 11                     | 1663      | Codifica para una DNA helicasa involucrada en proliferación celular.  | Reportado como blanco de NRF2. |                         |                 |             | Yaari-Stark et al         |

**Tabla 8.** Blancos de *NRF2* encontrados en genes a la alta incluyendo *JDP2*. Se resalta en rojo, el gen relacionado con *NRF2*, *JDP2* que actúa como inductor de la vía.

| Gen  | Entrez ID | Función  | Etiqueta                              | Tipo de interacción            | Direccionalidad  | Efecto             | Ref                    |
|--|-----------|--|---------------------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------|------------------------|
| <b>NUDT4 *</b><br>Nudix Type Motif 4                               | 11163     | Regulación del transporte intracelular.  | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>SP110 *</b><br>SP110 Nuclear Body Protein                       | 3431      | Regulación en la transcripción génica; biogénesis del ribosoma.  | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>TOP1MT *</b><br>Topoisomerase (DNA) I, Mitochondrial            | 116447    | Cataliza la rotura transitoria y la unión del DNA.   | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>FXR1 *</b><br>Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1 | 8087      | Codifica para una proteína de unión a RNA,   | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>SASH3 *</b><br>SAM And SH3 Domain Containing 3                  | 54440     | Señalización celular. Linfocitos.  | <b>Reportado como blanco de NRF2.</b> |                                |                  |                    | qiagen y fantom        |
| <b>FAM118B *</b><br>Family With Sequence Similarity 118, Member B  | 79607     | Formación de los cuerpos de cajal.   | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>NALCN *</b><br>Sodium Leak Channel, Non Selective               | 259232    | Canal catiónico no selectivo, independiente de voltaje.  | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>CREB5 *</b><br>CAMP Responsive Element Binding Protein 5        | 9586      | Se une al elemento de respuesta cAMP activa la transcripción.  | <b>Regulación transcripcional</b>     | <b>Transcripcional directa</b> | <b>Indirecta</b> | <b>Desconocido</b> | Türei et al Papp et al |
| <b>JDP2 *</b><br>Jun Dimerization Protein 2                        | 122953    | <b>Asociación reportada en 2013. JDP2 se une directamente a las secuencias ARE, en compañía del complejo NRF2-Mafk y aumenta la unión al DNA de estas dos ultimas proteínas, con lo que promueve la transcripción de genes blanco de NRF2. La expresión a la alta de JDP2 implica una mayor activación de la vía NRF2.</b> |                                       |                                |                  |                    | Tanigawa et al         |



**Tabla 9.** Blancos de *NRF2* encontrados en genes a la baja. Se resalta en azul, el gen relacionado con *NRF2*, *PGAM5* que actúa como represor de la vía.

| Gen  | Entrez ID | Función  | Etiqueta                   | Tipo de interacción     | Direccionalidad | Efecto      | Ref   |
|--|-----------|--|----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------|---|
| RTN2 *<br>Reticulon 2  | 6253      | Formación del retículo endoplasmico tubular.   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| CCL8 *<br>Chemokine (C-C Motif) Ligand 8   | 6355      | Actividad quimotactica para monocitos, linfocitos.   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| TRIM33 *<br>Tripartite Motif Containing 33   | 51592     | Corepresor transcripcional   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| MC1R *<br>Melanocortin 1 Receptor  | 4157      | Controla la melanogénesis  | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| IRAK3 *<br>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3                                | 11213     | Transducción de señales mediada por Toll/IL-R.   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| SEMA4D *<br>Semaphorin 4D  | 10507     | Señalización célula- célula. Reorganización del citoesqueleto.   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| RAP1GAP2 *<br>RAP1 GTPase Activating Protein 2                                       | 23108     | Activa en las plaquetas a la proteína RAP-1  | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| ZNF266 *<br>Zinc Finger Protein 266  | 10781     | Regulación de la transcripción.  | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| NNMT *<br>Nicotinamide N-Methyltransferase   | 4837      | Detoxificación celular   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| IKZF3 *<br>IKAROS Family Zinc Finger 3   | 22806     | Proliferación y diferenciación de linfocitos B   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| MYO3B *<br>Myosin IIIB   | 140469    | Polimerización de filamentos de actina   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| Capicua Transcriptional Repressor  | 23152     | Represor de la transcripción   | Regulación transcripcional | Transcripcional directa | Indirecta       | Desconocido | Türei et al<br>Papp et al                                   |
| PGAM5 *<br>PGAM Family Member 5, Serine/Threonine Protein Phosphatase, Mitochondrial | 192111    | Regulación de vía Interacción con NRF2 y KEAP1<br>Asociación reportada en 2006. PGAM5 es una serina/treonina proteasa que participa en el secuestro de KEAP1. Sin embargo, es también capaz de interactuar directamente con NRF2 a quien inhibe.<br>La expresión a la baja de PGAM5 implica una mayor activación de la vía NRF2. |                            |                         | Indirecta       | Inhibición  | Türei et al<br>Papp et al<br>Lo et al 2006<br>Lo et al 2008 |

Otras fuentes para identificar los blancos de NRF2 fueron la base de datos de qiagen (EpiTect ChIP qPCR Primers- transcription factors) y FANTOM4 (<http://fantom.gsc.riken.jp/4/download/>) que permiten ver los factores de transcripción que se unen a la región promotora de un gen particular. Y en el caso de un gen, se utilizó información de un artículo de Yaari-Stark et al [108] .

En total encontramos 16 blancos directos y un gen íntimamente relacionado con *NRF2*, *JDP2* (Jun Dimerization Factor 2) que se sabe actúa como un inductor de la vía de *NRF2* [109] (ver discusión) dentro del grupo de genes a la alta. Y en el conjunto de genes a la

baja, se advirtieron 12 blancos directos de *NRF2* y el gen *PGAM5* (phosphoglycerate mutase 5) que se une *NRF2*, y tiene un rol como represor de la vía [110] [111] (ver discusión).

El efecto de la regulación transcripcional mediada por *NRF2* en la mayoría de estos blancos, es desconocido y su direccionalidad indirecta, pero todos son genes corriente abajo del factor de transcripción y por ende miembros de la vía.

### 3.2.3 Validación por RT-PCR

Para este ensayo se eligieron tres genes diferencialmente expresados, como son: *JDP2*, *PGAM5* y *ACE*.

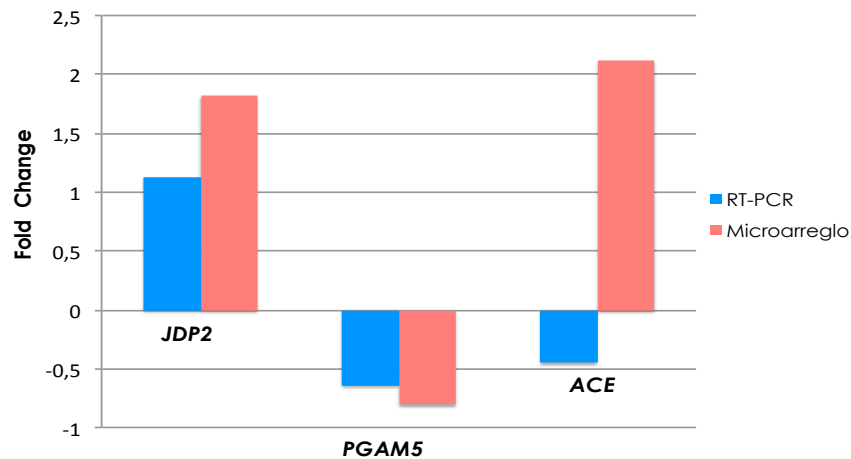
En este sentido, los dos primeros –como ya se menciono- están íntimamente relacionados con la regulación de la vía de *NRF2* y son uno de los hallazgos más interesantes evidenciados en este estudio, por lo que el validar sus niveles de expresión resultó crucial. Por otro lado, del grupo de genes blanco de *NRF2* encontrados a la alta en los pacientes con la mutación en *FH*, se escogió al azar el gen *ACE*.

Los resultados se aprecian en la Tabla 10 y la Figura 44, donde se advierte que los fold change tanto de la RT-PCR como del microarreglo son similares y van en la misma dirección para *JDP2* y *PGAM5*, lo que permite corroborar la expresión diferencial de estos dos genes en los pacientes con la mutación, en quienes el tener *JDP2* a la alta y *PGAM5* a la baja, implicaría indirectamente una sobreexpresión de la vía *NRF2*.

De otra parte, en el caso de *ACE* el desenlace no fue el esperado y la validación no fue exitosa; circunstancia que creemos puede ser atribuida a un fallo en el anillamiento de los primers a la región deseada. Ahora bien, el hecho de que hayamos tenido disponible una muy pequeña cantidad de muestra para este ensayo, impidió el uso de otro gen de referencia además *GADPH*, lo que tal vez afectó la normalización y pudo de alguna forma tener un efecto deletéreo en la validación de *ACE*. Ambos escenarios, son causas comunes de error durante la validación por RT-PCR, como ha sido expuesto por algunos autores [100] [112].

**Tabla 10.** Resultados validación por RT-PCR. La RT-PCR se hizo en las 6 muestras individuales (CP1, CP2, CP3 NEW, CN1, CN2 REP, CN3 REP). Luego se calcularon los valores Ct y delta Ct promedio para las muestras de los pacientes y las muestras de los controles. Los fold change se determinaron usando la formula:  $2^{(-\text{delta delta Ct})}$  ( = (delta Ct de muestras de los pacientes - delta Ct de muestras control ) ). Se listan en la segunda columna los identificadores de los primers utilizados de la compañía Thermo Fisher.

| Gen          | Primer ID Thermo Fisher | delta delta Ct | RT-PCR Fold change | Microarreglo Fold change |
|--------------|-------------------------|----------------|--------------------|--------------------------|
| <b>JDP2</b>  | Hs00185689_m1           | -0.73          | 1.13               | 1.82                     |
| <b>PGAM5</b> | Hs00540846_g1           | 0.63           | 0.64               | 0.80                     |
| <b>ACE</b>   | Hs01104602_g1           | 1.12           | 0.45               | 2.12                     |



**Figura 43.** Representación grafica de los fold change obtenidos con la RT-PCR y los microarreglos para cada gen.



## 4. Discusión

El presente estudio, buscó caracterizar y reportar una familia colombiana con el Síndrome HLRCC, en la que además se evidenció una mutación en *FH* nunca antes mencionada en la literatura.

Se trata de un hallazgo, relevante ya que el Síndrome HLRCC, tal y como hemos mencionado, es una enfermedad rara, de la que inclusive no se cuenta con datos de incidencia, [6] y no ha sido objeto de investigación en Latinoamérica ni en Colombia, donde las estadísticas del cáncer renal son escasas y no se establece una clara diferencia entre los casos esporádicos y hereditarios; por lo que este reporte puede enriquecer el conocimiento clínico y genético, sobre la patología en esta parte del mundo.

La familia aquí reportada, contrario a lo expuesto en la literatura no presenta los leiomiomas cutáneos característicos de la enfermedad [1] [2] [26], sin embargo si exhibe uno de los hallazgos menos comunes y tal vez el más devastador de todos, el cáncer renal papilar tipo 2 [1] [2] [26] [27]; que puede estar en un 20% de las familias y supone para los miembros portadores de la mutación, un riesgo durante la vida de padecer este cáncer de aproximadamente un 15% [27], sin que aparentemente, como menciona Menko y colaboradores, influya el tipo de mutación [27].

La mutación en *FH* que aquí se describe y de la cual se espera muy pronto publicar su reporte, la c.1349\_1352delATGA, es una delección de 4 bases que genera un frameshift, que compromete el exón 9 del gen. Produce un codón de parada a nivel de la proteína, en el tercer marco de lectura, y la trunca, por lo que suponemos afectaría notablemente su funcionamiento normal.

*FH* codifica para la proteína fumarato hidratasa, que en el ciclo de Krebs, cataliza la conversión de fumarato en malato [10], la pérdida de función de la enzima, implica una acumulación de fumarato [11] [12] y una alteración en la fosforilación oxidativa, por lo que los tumores deficientes de *FH*, suplen sus requerimientos energéticos mediante glicolisis aeróbica, y ello no es más que un cambio energético, conocido como el efecto Warburg [32]. Así mismo, las altas concentraciones de fumarato, implican la sobreactivación de las

vías de *HIF1-a* [12] [10] y de NRF2 [11] [3] y la alteración de los niveles de AMPK que se disminuyen notablemente [6]; estos tres efectos actualmente se consideran, como el core central de la fisiopatología del cáncer en el síndrome HLRCC y sitúan al fumarato como un probable oncometabolito [11].

Así que, parecería lógico asumir que entre más deletérea es una mutación en *FH*, es mayor el impacto funcional en la enzima y es mayor la acumulación de fumarato y esto de alguna forma, se puede reflejar en un fenotipo tumoral más agresivo; no obstante, aseverar esto con total certeza es muy complicado, y como ha sido discutido por otros autores [26] [31] [33] [113] [114] no existen asociaciones claras entre las mutaciones en *FH*, el tipo de cáncer o su gravedad. Luego, estudios que logren aclarar mejor la relación genotipo-fenotipo en esta patología son necesarios, y en consonancia con esta idea, este trabajo de tesis ha servido de base para la consecución de otro proyecto de investigación -que actualmente esta en curso-, y que buscará realizar un análisis computacional de las implicaciones estructurales y metabólicas de la mutación aquí descrita, a nivel de la proteína fumarato hidratasa.

Por ahora, hasta que no se tengan datos finales de el estudio in silico, sólo se puede decir que la mutación encontrada, se dio en una familia en la que predominan como manifestaciones del HLRCC: el cáncer renal -el probando y 8 miembros de la familia ya fallecidos, lo presentaron-, y los leiomiomas uterinos en mujeres, -las dos mujeres positivas para la mutación los tuvieron-. Aunque no son los únicos hallazgos de importancia.

Y es que, dentro de la evaluación clínica, se incluyó un ítem especial para determinar si los pacientes tenían algún antecedente de quistes renales, dado que es sabido que los afectados, tienen riesgo no solo de desarrollar una neoplasia maligna renal, sino también quistes renales benignos [2], los que como se demostró, en el trabajo de Adam y colaboradores [3] pueden constituir el primer estadio de carcinogénesis en el tejido renal, al menos en modelos murinos deficientes de *FH*.

Dos pacientes con la mutación, tenían ecografías y Tomografías Axiales Computarizadas (TAC) abdominales con evidencia de quistes renales bilaterales pequeños, que fueron

evidentes en un individuo a los 28 años (Tabla 1) y en el otro a los 65 años (Tabla 2).

El hecho de que una paciente femenina (Figura 25), que fue negativa para el análisis de mutación en línea germinal en *FH* –el cual vale la pena decir, se realizó dos veces– presentara también los quistes renales bilaterales, solo ilustra, primero cuán común puede ser este hallazgo en adultos, donde se cree la prevalencia puede ser de un 20 a 50% [115] [116] [117] y segundo, el por qué la presencia de quistes renales, no se considera un hallazgo sensible dentro del diagnóstico clínico del HLRCC; si bien –según nuestra opinión– debe ser valorado en los portadores de la mutación.

De otra parte, es necesario ser cuidadoso a la hora de tener en cuenta la historia de fibromas uterinos, que generalmente se aprecian antes de los 40 años, como fue el caso de las mujeres positivas; en comparación con una mujer de la familia que no presentó la mutación y tuvo una edad de inicio de síntomas después de los 50 años.

Se quiso también conocer si habían otros tipos de cáncer, además del renal en la familia. Como se aprecia en el árbol genealógico, dos mujeres de la primera generación (Figura 25), fallecieron por cáncer pero se desconoce su localización o tipo. Del único sujeto que teníamos datos confiables, de que había padecido otro tipo de cáncer, fue del III-9, que tiene la mutación en *FH*, y presentó reportes de patología que demostraban el antecedente de un carcinoma basocelular de piel y un cáncer de testículo por tumor de células de Sertoli, ambos ya en remisión.

La respectiva revisión de la literatura, mostró que se han descrito otros tumores poco frecuentes, además del leiomioma uterino, en los afectados por HLRCC, entre otros: estromales gastrointestinales [1] [118], glándula adrenal [1] [119], seno [29], vejiga [29], y de testículo, específicamente células de Leydig [120], más no de Sertoli. En relación al carcinoma basocelular, Lehtonen en 2006 [120], reporta dos pacientes positivos para mutación en *FH*, con este cáncer. De manera, que el paciente de este reporte, que exhibe dos cánceres infrecuentes en el contexto del HLRCC, constituye un hallazgo muy poco común.

Pero lejos, de las manifestaciones clínicas raras o inespecíficas, se debe mencionar que la familia de este reporte, hace parte de aquellas que han sufrido por el desconocimiento

de la enfermedad por parte del equipo médico. En el primer contacto con ellos, relataron cómo habían sido ignorados tantas veces, por los servicios de salud en donde no cabía la posibilidad de que ese cáncer renal que se pasaba de una generación a otra y que fue la causa de muerte de varios miembros de la familia antes de los 40 años, fuese hereditario. Esto solo indica, que para mejorar el subdiagnóstico del HLRCC que ha sido ampliamente comentado [1] [121], primero es necesario crear la conciencia en médicos en general, especialistas y por qué no en los administradores de salud, de que se trata de una patología real, que requiere de un diagnóstico certero, un adecuado manejo interdisciplinario, un seguimiento estricto de las complicaciones y en nuestro concepto, una buena asesoría genética como pilar de todo lo demás.

Como se mencionó, en el apartado de materiales y métodos, a todos los pacientes negativos y positivos para la mutación se les brindó una asesoría genética, en la que además de comunicar el resultado y solucionar dudas, se dio inicio en el caso de los portadores de la mutación a un plan de seguimiento, como el que estipula el HLRCC Alliance [30] y Menko y colaboradores [27].

Especial atención, se tuvo en el caso de los menores de edad, antes y después de obtenidos los resultados del estudio de mutación. Dado que existen reportes de pacientes con HLRCC, con el cáncer renal papilar tipo 2 antes de los 8 a 10 años, [27] [122] el estudio genético en los niños para HLRCC, se puede catalogar como un estudio genético predictivo para una condición que tiene un riesgo de presentarse en la niñez [38]; esto sumado a la gran ansiedad que mostraron los padres, de querer conocer el estado portador o no de sus hijos, justificó la realización del análisis en los mismos.

Siguiendo las últimas recomendaciones de la Academia Americana de Pediatría de 2013 [123], se aplicó un asentimiento informado y un consentimiento informado para los padres o guardianes legales, que fueron los que recibieron el resultado y a quienes se les instruyó en comunicar este a sus hijos a una edad apropiada, dadas las repercusiones de este tipo de pruebas en el individuo y su entorno. Ninguno de los niños en esta investigación, fue positivo para la mutación en *FH*.

Este trabajo no solo realizó la caracterización genética y clínica de los pacientes, sino que además quiso investigar uno de los aspectos más intrincados y tal vez uno, de los más fascinantes de la fisiopatología del síndrome HLRCC, como lo es la vía de *NRF2*, un factor de transcripción incomprendido aún, y cuyos roles duales y disimiles, lo convierten en una molécula compleja.

En el contexto del síndrome HLRCC, se cree que *NRF2* se sobreactiva gracias a que las altas concentraciones de fumarato inhiben mediante succinización a la proteína KEAP1, encargada de acoplar al factor de transcripción a una ubiquitin ligasa que lo marca para degradación por el proteosoma [3] . De esta forma, *NRF2* escapa a la degradación y puede translocarse libremente al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes blanco, los cuales mediarían en procesos de malignización al promover la supervivencia, crecimiento y proliferación celular, la resistencia a quimioterapéuticos, la angiogénesis, el transporte de glucosa, entre otros [36].

Empero, la cadena exacta y cronológica de los eventos que suceden en las células deficientes de *FH* y con la amplificación de la ruta de *NRF2*, sigue siendo un misterio y se desconoce si *NRF2* es el que origina la transformación neoplásica del tejido o el que se encarga de mantener a las células del mismo. Lo único, que parece claro, es que para que se de el aumento de *NRF2*, debe existir entre otros sucesos, un aumento patológico del fumarato en la célula [32] [11]. Y fue esta noción, la que nos llevó analizar las concentraciones de fumarato en los pacientes con la mutación patogénica en *FH*.

Ante la imposibilidad de obtener tejido tumoral renal del afectado y ante la carencia de leiomiomas cutáneos en esta familia, los cuales hubiesen podido ser, -mediante biopsia-, otra fuente de material con deficiencia de *FH*, se optó por realizar un análisis no invasivo en orina -en un portador de la mutación y el afectado por el cáncer renal-, mediante CG/EM, prestando especial atención a la medición de ácido fumárico y málico, que dan cuenta indirectamente de la actividad enzimática de la fumarato hidratasa.

Los resultados de este abordaje fueron normales en los dos pacientes, y esto puede deberse a dos razones principales: 1. al igual que en otros síndromes de predisposición a cáncer, para que se generen los tumores en el HLRCC, se requiere la inactivación total

del gen *FH*, mediante dos hits -como expuso Knudson en 1971- el primero una mutación de línea germinal y el segundo una mutación somática que ocurra a nivel de las células del tejido [2].

De manera, que si se parte del supuesto de que el HLRCC, sigue fielmente esta hipótesis, habría que inferir que es cuando se da la inactivación total del gen y la no producción de la enzima en las células, que las concentraciones de fumarato aumentan; evento que sólo podría advertirse en tejido tumoral. Esto en parte, parece ser apoyado por el artículo de Zheng y colaboradores [124], quienes en ratones con una delección bialélica de *fh* específica para tejido renal, encontraron con análisis metabolómicos, un aumento en la excreción urinaria de fumarato y arginosuccinato. No obstante, si lo que se requiriera para que el fumarato urinario estuviese elevado, es la inactivación de *FH* en células renales, el probando afectado por el cáncer, debió haber tenido un resultado anormal, lo cual no sucedió y esto lleva a la segunda razón, 2. la complejidad de la actividad enzimática de la fumarato hidratasa, pues a ciencia cierta, no se puede afirmar con total certeza, que su inactivación en los pacientes con HLRCC sea total y constante en el tiempo.

Basados en lo anterior, se puede concluir que la medición de las concentraciones de fumarato en orina en los pacientes con HLRCC, por ahora no es una metodología lo suficientemente sensible, específica o fiable, para determinar la actividad deficiente de la fumarato hidratasa; y que en condiciones de disponibilidad de tejido tumoral un buen abordaje podría ser la identificación por inmunohistoquímica del compuesto 2SC, producto de la succinización mediada por fumarato a diversas proteínas, como lo demostró Bardella et al [11]. Esta técnica, que aún no está disponible en el ámbito clínico ha probado ser bastante versátil y puede ser aplicada no solo en tejido renal [125], sino también en biopsias de leiomiomas cutáneos [126] y uterinos [127].

Ahora bien, fue de particular interés para este trabajo determinar si efectivamente la vía de *NRF2* se podría encontrar sobreactivada en los pacientes con mutación patogénica en *FH*. Para esto se llevó a cabo un análisis de microarreglos en células PBMC, en las que se ha visto que *NRF2* tiene buenos niveles de expresión basal [70] y que en otros

estudios de cáncer, donde la obtención de tejido tumoral es difícil o imposible, constituyen un buen reflejo del estado celular [68].

A través de un análisis estadístico, con SAM se identificó una lista de 81 genes diferencialmente expresados en las muestras de los pacientes con la mutación en *FH*, respecto a los controles sanos no relacionados. Después de remover los genes no codificantes, la listas definitivas, quedaron conformadas por 30 expresados a la alta y 32 expresados a la baja.

Dentro de la anotación funcional individual (Tablas 5 y 6) de los genes a la alta, llamó la atención que algunos exhibían funciones asociadas con proliferación celular y/o ciclo celular, respuesta inmune, ensamblaje del citoesqueleto, adhesión celular y angiogénesis y autofagia, todos estos relacionados de alguna forma con cáncer [128] [129] [130][131][132].

El enriquecimiento singular y modular, ayudó a separar las listas de genes expresados a la alta y a la baja en cuanto a anotaciones biológicas. En el caso de los genes a la alta, la función molecular, unión a metales, fue la más enriquecida, mientras para los genes a la baja, fue el término transcripción. Sin embargo, en el análisis de co-ocurrencia modular hecho con Genecodis, se encontró que ambas listas tenían términos enriquecidos en común, de los cuales vale la pena resaltar nuevamente, la aparición del ítem unión a metales.

La asociación entre genes que codifican para proteínas con actividades relacionadas con unión a metales y *NRF2*, es ya conocida [133] [134] [135]. Se ha observado, que estas proteínas en su mayoría enzimas, participan en reacciones de detoxificación, que tienen por objeto proteger a las células de los efectos deletéreos de los metales pesados; [135]. y buen número de estas, se encuentran bajo el control de la vía *NRF2*, que ante la presencia de iones y complejos metálicos en la célula, se activa para mitigar el estrés oxidativo [133] [134].

Que dentro de los términos enriquecidos estuviese unión a metales como una característica predominante en la lista de genes a la alta, puede sugerir una posible activación de *NRF2*.

En este orden de ideas, respecto a los resultados de la identificación de blancos de *NRF2* en la lista de genes diferencialmente expresados, habrá que decir, que el hecho de haber observado 16 blancos directos de *NRF2* expresados a la alta vs. 12 blancos directos que se expresaron a la baja, es un indicio de que probablemente existe una sobreactivación de la vía de este factor de transcripción en pacientes con la mutación en *FH*. Suposición, que también se fundamenta, en el sorpresivo pero muy importante hallazgo, de la presencia a la alta y a la baja respectivamente, de un activador de *NRF2* (el gen *JDP2*) y de un represor de esta misma vía (el gen *PGAM5*).

El gen de *JDP2*, codifica para una proteína que contiene regiones de cremallera bZIP (basic zipper por sus siglas en inglés) la cuales le permiten una interacción directa con el DNA [109]. Dentro de sus funciones, se destaca la represión del factor de transcripción AP-1 (Activation Protein 1) que pertenece a la familia de cremalleras de leucina, y estructuralmente esta formado por un dímero compuesto de subunidades jun/ fos [136]. [137] AP-1 y sus genes blanco han sido asociados con múltiples procesos, que incluyen embriogénesis, respuesta inflamatoria, señalización, crecimiento y proliferación celular [137]. Un incremento de AP-1 y algunos de sus genes corriente abajo, ha sido advertido en varios cánceres [138] .

Tanto *AP-1* como *JDP2*, se han correlacionado con la respuesta celular a estrés oxidativo e hipoxia [137] [139]. En el caso de *JDP2*, dicha asociación fue validada por Tanigawa y colaboradores en el año 2013, cuando al usar ratones knockout para este gen, se encontró no solo un aumento de ROS en las células, sino que además una sustancial disminución de genes con elemento ARE pertenecientes a la vía de *NRF2*. Ensayos de ChIP llevados a cabo en estos mismos modelos celulares, permitieron descubrir que *JDP2* hace parte de un complejo de unión a DNA, en el que está *NRF2* y las proteínas MAFK (Figura 44). *JDP2*, actuaría como un cofactor capaz de incrementar la unión al DNA del complejo *NRF2*/MAFK; sin la presencia de *JDP2*, si bien *NRF2*/MAFK se reclutan al núcleo, estos no son lo suficientemente eficientes para estimular la actividad



del promotor ARE [109]. El hecho de que *JDP2* presente dominios de unión para DNA y para NRF2/MAFK, nos hace pensar que puede tratarse de una especie de proteína transactivadora, que serviría también de anclaje estructural entre el DNA y el complejo NRF2/MAFK.

Por su parte, PGAM5 es una serina/treonina fosfatasa que se encuentra localizada en la mitocondria, desde donde parece regular mecanismos de muerte celular [140]. A nivel estructural, posee en su extremo C terminal, un motivo de unión para la proteína antiapoptotica Bcl-xL y en su extremo N terminal, presenta un sitio de unión para KEAP1. No obstante, la relación entre estas tres proteínas (PGAM5, Bcl-xL y KEAP1) va mas allá de una mera interacción estructural y resulta un evento celular complejo. En primer lugar, PGAM5 es en si mismo un sustrato de KEAP1 [140] este último se encarga de controlar la degradación por el proteosoma tanto de PGAM5 como de Bcl-xL, ante estímulos celulares. Y al mismo tiempo, es PGAM5 la encargada de mantener en la membrana externa mitocondrial a NRF2 y KEAP1, con los que forma un complejo ternario [111] (Figura 44), que los secuestra lejos del núcleo, impidiendo de esta forma la activación de los genes de la vía de *NRF2* [141].

Al respecto de las implicaciones, de este complejo ternario Xue et al (2015) [141] comentan que es el equilibrio estructural de este, el que resulta crucial para las oscilaciones translocaciones del factor de transcripción (Figura 44). En condiciones de estrés celular *NRF2*, se importa rápidamente al núcleo liberándose del complejo ternario y una vez que ha finalizado el estímulo celular nocivo, una proteína Fyn fosforila a *NRF2* para promover su exportación del núcleo. Lo novedoso, de las conclusiones del estudio de Xue et al [141] – que vale la pena decir implementó modelos matemáticos para comprender las intrincadas dinámicas de las reacciones que suceden en la vía de *NRF2*- es que propone dos escenarios distintos de cual seria el destino final de este factor de transcripción, una vez que ha finalizado su acción nuclear. Así pues, 1. NRF2 podría ser degradado por el proteosoma a su salida del núcleo o 2. podría volverse a unir a PGAM5 y KEAP1 en la membrana externa mitocondrial, esperando una nueva señal de estrés oxidativo y/o electrofílico, para translocarse al núcleo [141].

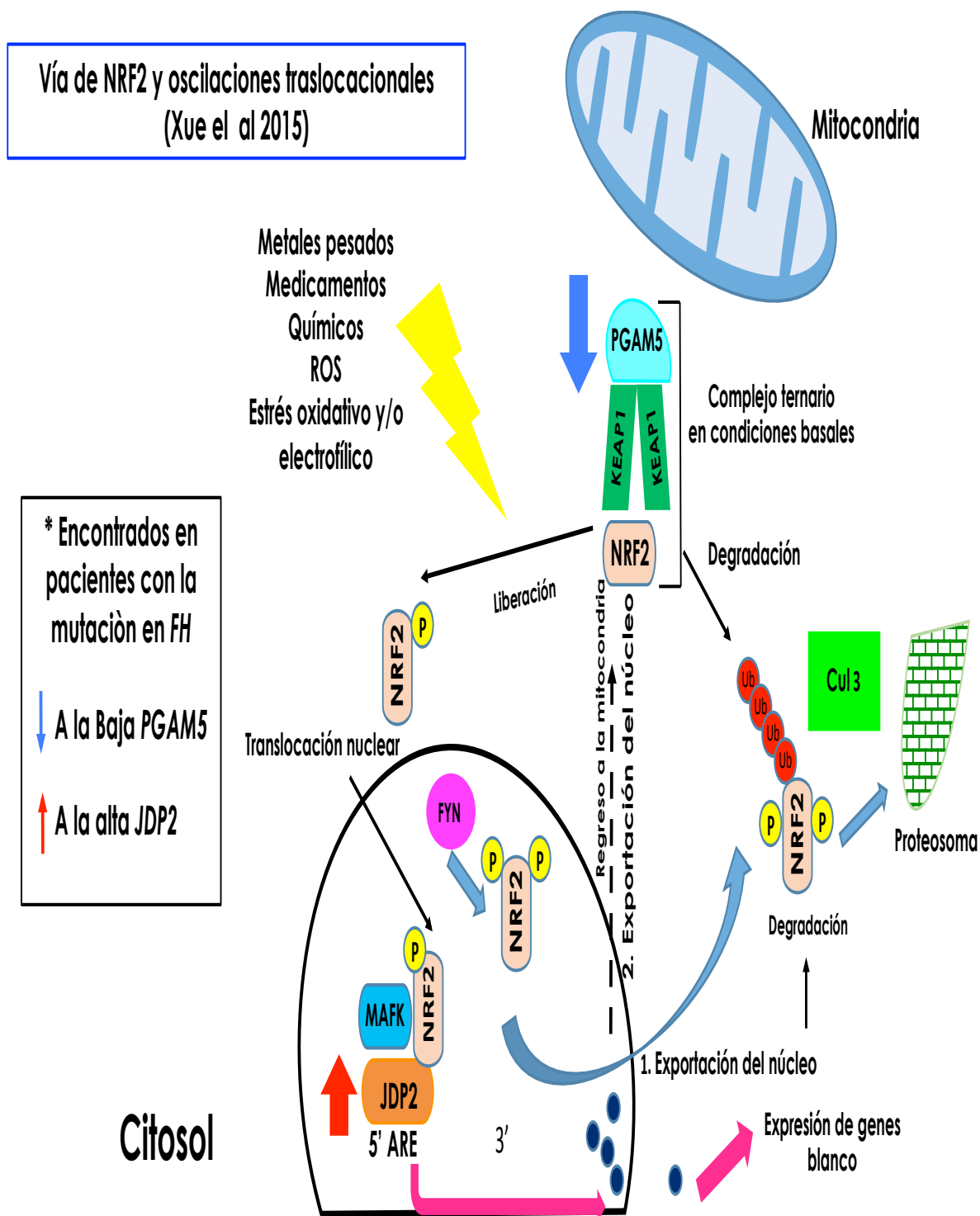
Lo cierto, es que una disminución o silenciamiento de *PGAM5* implica una activación de la vía *NRF2*, la cual se infiere por un aumento en la expresión de sus genes blanco; hecho que fue confirmado por Xue y colaboradores, que demostraron en células knockdown para *PGAM5* un aumento de la transcripción de *NQO1* [141].

El vínculo entre *PGAM5* y la vía *NRF2*, también lo advertimos por los datos recogidos en la base de datos NRF2ome, donde se listan dentro de las interacciones proteína - proteína (manualmente curadas) dos efectos directos de la unión de *PGAM5* a KEAP 1 y *NRF2*, que son inhibición directa e indirecta, respectivamente.

Encontrar a *JDP2* expresado a la alta y a *PGAM5* expresado a la baja, constituyen dos relevantes indicios de una sobreexpresión de la vía *NRF2* en los pacientes con la mutación en *FH*, y tal vez futuros abordajes puedan ayudar a establecer la utilidad de estos dos genes, como biomarcadores o inclusive blancos terapéuticos en estos pacientes.

El hecho de que no se haya observado a *NRF2* en la lista de genes diferencialmente expresados a la alta, asumimos que puede deberse a que los microarreglos dan un panorama general, de un instante en la célula, la cual continuamente esta sujeta a cambios en respuesta a eventos ambientales [142] [143]. Además, como lo expone Jaluria y colaboradores, es ingenuo pensar que hay una correlación directa entre la expresión génica y las cantidades de proteína traducida, por lo que las conclusiones de este tipo de estudios transcriptómicos, merecen ser evaluadas con cautela. A todo lo anterior, se le suma el hecho que como ya se comentó, *NRF2* sufre oscilaciones en su localización subcelular [141] y aun cuando se encuentre patológicamente activado, no significa que estará constantemente en el núcleo dirigiendo la transcripción de sus genes blanco.

Finalmente, hay que reseñar la importancia de continuar con investigaciones sobre *NRF2* en el contexto del HLRCC, pues es un campo prometedor del que aún desconocemos infinidad de aspectos.



**Figura 44.** Representación grafica de la vía de *NRF2* a partir de los hallazgos de este estudio y lo comentado por Xue et al.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

- Este estudio, reporta una familia colombiana con el Síndrome HLRCC sin leiomiomas cutáneos, pero si con varios miembros afectados por el cáncer renal, fibromas uterinos y tumores poco comunes.
- Se describe también una mutación nueva en *FH* que genera truncamiento de la proteína y la cual se considera patogénica.
- En los pacientes con la mutación en *FH*, no se logró identificar en orina un aumento en las concentraciones de fumarato; por lo que se recomienda que próximos estudios, empleen otra metodología que implique el uso de muestras de tejido tumoral, en las que tal vez la utilidad del fumarato como biomarcador pueda ser realmente validada. Vale la pena decir, que en el contexto particular de este trabajo, la consecución de dichos especímenes, fue imposible, como ya ha sido explicado.
- Los resultados aquí discutidos, aportan elementos importantes para suponer que si hubo una sobreactivación de la vía de *NRF2* en los pacientes con la mutación en *FH*. En estos, no sólo se logró evidenciar la presencia de varios blancos directos del factor de transcripción, expresados a la alta; sino que además, se hallaron dos genes íntimamente relacionados con el control de esta ruta biológica, como son *JDP2* y *PGAM5*.

Tal y como ya se comentó, por su comportamiento en los individuos con la mutación y sus funciones, *JDP2* y *PGAM5* podrían llegar a ser blancos terapéuticos o biomarcadores relevantes, en pacientes con HLRCC.

- Este estudio puede aportar al conocimiento sobre la clínica, la genética y los mecanismos fisiopatológicos del síndrome HLRCC en Colombia y en Latinoamérica, donde muy probablemente exista un subdiagnóstico de está y otras enfermedades de predisposición a cáncer hereditario.

## 6. Bibliografía

1. Smit DL, Mensenkamp AR, Badeloe S, Breuning MH, Simon MEH, van Spaendonck KY, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families referred for fumarate hydratase germline mutation analysis. *Clin Genet*. 2011; 79: 49–59.
2. Schmidt Laura S, Linehan W. Marston. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2014;7: 253–260.
3. Adam Julie, Hatipoglu Emine, O'Flaherty Linda, Ternette Nicola, Sahgal Natasha, Lockstone Helen et al. Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling. *Cancer cell*. 2011;20: 524-537.
4. Iván Camilo Ospina Ospina. Panorama general del Cáncer en Colombia. *Revista Digital ALTUS en Línea* [Internet]. [actualizado 2013 Mayo; citado 02 Julio 2014]. Disponible en: <http://www.usergioarboleda.edu.co/altus/articulo-panorama-general-del-cancer-en-Colombia.htm>
5. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Cáncer en las Américas. Perfiles de país 2013. *Salud en las Américas* [Internet]. [actualizado Enero 2013; citado 02 Julio 2014]. Disponible en: [http://paho.org/%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom\\_docman%26task%3Ddoc\\_download%26gid%3D24076%26Itemid%3D&ei=ZPfgVLbRGlyggSiyoOgCQ&usg=AFQjCNH4jbEffPlhB3nyhuFqVngStByJ9A&bvm=bv.85970519,d.eXY](http://paho.org/%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D24076%26Itemid%3D&ei=ZPfgVLbRGlyggSiyoOgCQ&usg=AFQjCNH4jbEffPlhB3nyhuFqVngStByJ9A&bvm=bv.85970519,d.eXY).
6. Verine Jerome, Pluvinage, Amelie Bousquet Guilhem, et al. Hereditary Renal Cancer Syndromes: An Update of a Systematic Review. *EUROPEAN UROLOGY*. 2010;58(5): 701 – 710.
7. Linehan W. Marston, Rouault Tracey A. Molecular Pathways: Fumarate Hydratase-Deficient Kidney Cancer—Targeting the Warburg Effect in Cancer. *Clin Cancer Res*; 2013; 19 (13): 3345–52.
8. Ljungberg B., Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M et al. *EUA Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 update*. *European Association of Urology*. 2015;6047: 1-12.
9. Genereview [Internet]. Washington: Genereview; 2006. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. [actualizado 13 de abril 2010; citado 02 Julio 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>
10. Sudarshan S, Linehan WM, Neckers L. HIF and fumarate hydratase in renal cancer. *British Journal of Cancer*. 2007; 96: 403 – 407.
11. Bardella Chiara, El-Bahrawy Mona, Frizzell Norma, Adam Julie, Ternette Nicola, Hatipoglu Emine et al. Aberrant succination of proteins in fumarate hydratase-deficient mice and HLRCC patients is a robust biomarker of mutation status. *J Pathol*. 2011; 225: 4–11.
12. Aikseng Ooi, Furge Kyle A. Fumarate hidratasa inactivation in renal tumors: HIFa, NRF2 and “cryptic targets” of transcription factors. *Chin J Cancer*. 2012;31(9): 413-420.
13. Niture Suryakant K., Kaspar James W., Shen Jun, Jaiswal Anil K. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010; 244:37–42.
14. Piñeros Petersen M, Pardo Ramos C, Gamboa Garay Ó, Hernández, Suárez G. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Instituto Nacional de Cancerología. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia 2002-2006. Primera edición. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología; 2010.
15. Huang C, Terng H, Chou Y, Su S, Chang Y, Chen C, et al. Microbial & Biochemical Technology A Gene Expression Profile of Peripheral Blood in Colorectal Cancer. 2014;6(2):102-9.
16. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, Mallya K, Sasson AR, et al. Transcriptional Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Pancreatic Cancer Patients Identifies Novel Genes with Potential Diagnostic Utility *PLoS ONE*. 2011;6(2): 1-10.
17. Burczynski ME, Twine NC, Dukart G, Marshall B, Hidalgo M, Stadler WM, et al. Transcriptional Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells Prognostic of Clinical Outcomes in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1181-1189.
18. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol. European Association of Urology*; 2015;67(3):519-30.

19. Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3387-92.
20. Linehan W, Srinivasan R, Schmidt L. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):277-85.
21. Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2012;200(2):1-13.
22. Ooi A, Dykema K, Ansari A, Petillo D, Snider J, Kahnoski R, et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(7):2044-51.
23. Maher J, Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling—The evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1):4-15.
24. TCGA. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;Submitted:1-11.
25. Ministerio de la Protección Social [Internet]. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2012. Plan nacional para el control del cáncer en Colombia 2012-2020. [actualizado Marzo de 2012; citado 02 Julio 2014] Disponible en: <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20nacional%20para%20el%20control%20del%20cáncer%20en%20Colombia.pdf>.
26. Toro JR, Nickerson ML, Wei M-H, Warren MB, Glenn GM, Turner ML, et al. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet*. 2003;73(1):95-106.
27. Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, Pollard PJ, Mitchell M, Tyrer JP, et al. Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum Mol Genet*. 2003;12(11):1241-52.
28. Menko FH, Maher ER, Schmidt LS, Middleton LA, Aittomäki K, Tomlinson I, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC): renal cancer risk, surveillance and treatment. *Fam Cancer*. 2014;13(4):637-44.
29. Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA, et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet*. 2006;43(6):523-6.
30. HLRCC Family Alliance. The HLRCC handbook. HLRCC Family Alliance. [Internet] 2013. [Citado 02 Julio 2015]. Disponible en: <http://www.hlrccinfo.org/handbook/HLRCC-HANDBOOK.pdf>.
31. Multiple T, Consortium L. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. 2002;30(april):406-11.
32. Linehan WM, Rouault TA. Molecular pathways: Fumarate Hydratase-deficient kidney cancer - Targeting the warburg effect in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3345-52.
33. M-H Wei, O Toure, G M Glenn, M Pithukpakorn, L Neckers, C Stolle, P Choyke, R Grubb, L Middleton, M L Turner, M M Walther, M J Merino, B Zbar, W M Linehan, J R Toro, Wei MH, Toure O, Glenn GM, et al. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2006;43(1):18-27.
34. Nagai R, Brock JW, Blatnik M, Baatz JE, Bethard J, Walla MD, et al. Succination of protein thiols during adipocyte maturation: A biomarker of mitochondrial stress. *J Biol Chem*. 2007;282(47):34219-28.
35. Blatnik M, Frizzell N, Thorpe SR, Baynes JW. Inactivation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by Fumarate in Diabetes. 2008;57(January):41-9.
36. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*. 2011;16(2):123-40.
37. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. Elsevier; 2013;1(1):45-9.
38. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(4):176-88.
39. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2—an update. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:36-44.
40. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway.

Trends Pharmacol Sci Elsevier Ltd. 2013;34(6):340-6.

41. Gañán-Gómez I, Wei Y, Yang H, Boyano-Adánez MC, García-Manero G. Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:750-64.

42. Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med*. 2013;57:119-31.

43. Jayakumar S, Pal D, Sandur SK. Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutat Res Elsevier B.V.* 2015;779:33-45.

44. Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, et al. Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(10):3423-32.

45. Geismann C, Arlt A, Sebens S, Schäfer H. Cytoprotection «gone astray»: Nrf2 and its role in cancer. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1497-518.

46. Zhou S, Ye W, Shao Q, Zhang M, Liang J. Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(3):706-15.

47. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Hussain S, et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(6):806-14.

48. Banerjee P, Basu A, Wegiel B, Otterbein LE, Mizumura K, Gasser M, et al. Heme oxygenase-1 promotes survival of renal cancer cells through modulation of apoptosis- and autophagy-regulating molecules. *J Biol Chem*. 2012;287(38):32113-23.

49. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer Nature Publishing Group*. 2012;12(8):564-71.

50. Xiang M, Namani A, Wu S, Wang X. Nrf2: bane or blessing in cancer? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(8):1251-9.

51. Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1235-43.

52. Wang XJ, Hayes JD, Henderson CJ, Wolf CR. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19589-94.

53. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(4):1433-8.

54. Olayanju A, Copple IM, Bryan HK, Edge GT, Sison RL, Wong MW, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2015;78:202-12.

55. Tang X, Wang H, Fan L, Wu X, Xin A, Ren H, et al. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic Biol Med Elsevier Inc*. 2011;50(11):1599-609.

56. Chian S, Thapa R, Chi Z, Wang XJ, Tang X. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. Elsevier Inc.; 2014;447(4):602-8.

57. Villeneuve NF, Tian W, Wu T, Sun Z, Lau A, Chapman E, et al. USP15 negatively regulates Nrf2 through deubiquitination of Keap1. *Mol Cell*. Elsevier Inc. 2013;51(1):68-79.

58. Sourbier C, Ricketts CJ, Matsumoto S, Crooks DR, Liao P-J, Mannes PZ, et al. Targeting ABL1-Mediated Oxidative Stress Adaptation in Fumarate Hydratase-Deficient Cancer. *Cancer Cell Elsevier Inc*. 2014;26(6):840-50.

59. Colicelli J. Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity *Sci Signal* 2011;3(139):1-46.

60. Metabocard for Fumaric acid ( HMDB00134 ) [Internet]. The metabolomics innovation centre. [actualizado 12 de febrero 2016; citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00134>

61. Metabocard for Malic acid ( HMDB00744 ). The metabolomics innovation centre. [actualizado 12 de febrero 2016; citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb00744>

62. Cromatografía de gases. [Internet] [citado 20 Marzo 2016]. Disponible en:

- [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gas\\_es.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gas_es.pdf)
63. Stashenko E, Martínez JR. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. [Internet] Intech. [citado 03 de Marzo 2016]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/46209.pdf>
64. Organic Acids Screen Urine [Internet] Mayo Clinic.[citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Performance/80619>
65. Matter F, Matter F. Organic acid analysisIn Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. Edited by N Blau, M Duran, ME Blaskovics KM Gibson. Berlin, NY, Springer, 2003, pp 27-44.
66. Xu Y, Xu Q, Yang L, Liu F, Ye X, Wu F, et al. Gene expression analysis of peripheral blood cells reveals Toll-like receptor pathway deregulation in colorectal cancer. PLoS One. 2013;8(5):e62870.
67. Palma P, Cuadros M, Conde-Muñoz R, Olmedo C, Cano C, Segura-Jiménez I, et al. Microarray profiling of mononuclear peripheral blood cells identifies novel candidate genes related to chemoradiation response in rectal cancer PLoS One. 2013;8(9):e74034.
68. Baine MJ, Menning M, Smith L, Kavita M. Differential gene expression analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells reveals novel test for early detection of pancreatic cancer. Cancer biomark. 2011;11(1):1-14.
69. Zhang P, Wei R, Wen X, Ping L, Wang C, Dong Z, et al. Genes expression profiling of peripheral blood cells of patients with hepatocellular carcinoma. Cell Biol Int. 2012;36:803-9.
70. Reszka E, Jablonowski Z, Wieczorek E, Gromadzinska J, Jablonoska E, Sosnowski M, Wasowicz W. Expression of NRF2 and NRF2-modulated genes in peripheral blood leukocytes of bladder cancer males. Neoplasma. 2013;60(2):123-8.
71. GeneChip ® Human Genome U133 Plus 2.0 Array. [Internet] 2015. [citado 02 Febrero 2015]. Disponible en: [http://www.affymetrix.com/catalog/131455/AFFY/Human+Genome+U133+Plus+2.0+Array#1\\_](http://www.affymetrix.com/catalog/131455/AFFY/Human+Genome+U133+Plus+2.0+Array#1_)
72. Adi L. Tarca. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. Am J Obstet Gynecol. 2006; 195(2): 373–388.
73. Burguete A, Mclachlan G, Bioarray C. Microarray Data Analysis for Differential Expression: a Tutorial. 2009;28(2):6-20.
74. GeneChip Array Overview. [Internet]. [consultado 05 de Mayo 2016] Disponible en: <http://www.ohsu.edu/xd/research/research-cores/gene-profiling-shared-resource/projectdesign/array-technology/affymetrix-genechip-arrays.cf>
75. Sánchez-Pla Alex, Ruz de Villa M. Carmen. Análisis de datos de microarreglos. [Internet] Universidad de Barcelona. [citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: [http://ueb.vhir.org/cursos/tiki-download\\_file.php?fileId=22](http://ueb.vhir.org/cursos/tiki-download_file.php?fileId=22)
76. Wolfgang Huber, Anja von Heydebreck, Holger Suettmann, Annemarie Poustka and Martin Vingron. Variance Stabilization Applied to Microarray Data Calibration and to the Quantification of Differential Expression. Huber Wolfgang, Heydebreck A, Poustka A, Vingron M. Bioinformatics 2002;18(1997):S96-104.
77. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(9):5116-21.
78. False discovery rate Advanced epidemiology [Internet] . [actualizado 21 de Enero 2015 ; citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.advancedepidemiology.org/false-discovery-rate/>
79. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. Bioinformatics. 2003;19(3):368-75.
80. Pawitan Y, Michiels S, Koscielny S, Gusnanto A, Ploner A. False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. Bioinformatics. 2005;21(13):3017-24.
81. Glickman ME, Rao SR, Schultz MR. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. J Clin Epidemiol. 2014;67(8):850-7.
82. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. Database (Oxford). 2010:1-16.
83. About GeneCards [Internet] Genecards. [actualizado 2015 ; citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://www.genecards.org/Guide/AboutGeneCards>
84. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 2009;37(1):1-13.



85. Rhee SY, Wood V, Dolinski K, Draghici S. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat Rev Genet.* 2008;9(7):509-15.
86. Huntley RP, Sawford T, Martin MJ, O'Donovan C. Understanding how and why the Gene Ontology and its annotations evolve: the GO within UniProt. *Gigascience* 2014;3(1):4.
87. Huang DW, Lempicki R a, Sherman BT. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
88. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):R3.
89. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1):478-83.
90. Hong G, Zhang W, Li H, Shen X, Guo Z. Separate enrichment analysis of pathways for up- and downregulated genes. *Journal of the royal societyInterface.* 2014;11(92):1-11.
91. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Bader GD, Morris Q. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *F1000Research.* 2014;3:153.
92. Genemania Documentation [Internet] [citado 20 Marzo 2016]. Disponible en: <http://pages.genemania.org/help/>
93. Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, Montojo J, Lopes CT, Bader GD, et al. GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):115-22.
94. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through chip-seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5718-34.
95. Chorley BN, Campbell MR, Wang X, Karaca M, Sambandan D, Bangura F, et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: Influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):7416-29.
96. Papp D, Lenti K, Módos D, Fazekas D, Korcsmáros T et al. The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS Lett.* 2012;586(13):1795-802.
97. Turei D, Papp D, Fazekas D, Lenti K, Korcsmáros T et al. NRF2-ome: An integrated web resource to discover protein interaction and regulatory networks of NRF2. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013(1).
98. Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(90001):91D - 94.
99. Thallinger GG. A Sequence Based Validation of Gene Expression Microarray Data. 2012;1(1):9.
100. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8(1):175-93.
101. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* 2006;22(2):101-9.
102. Universidad de Navarra [Internet]. Madrid: Universidad de Navarra- Centro de documentación en Bioética; 2012. Declaración de Helsinki. [actualizado 12 diciembre 2013; citado 02 Julio 2014]. Disponible: <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.unav.es%2Ffdb%2Famhelsinki2.pdf&ei=2EZVVPFkiKQ2zvODkA8&usg=AFQjCN GPECrLyubMQrHWHCQNXXOGJu55g&bvm=bv.78677474,d.eXY>.
103. Comisión Nacional para la protección de los sujetos humanos de investigación biomédica y comportamental [Internet]. México D.F: Bioeticaweb; 2013. Informe Belmont: Principios y guías éticos para la protección de los sujetos humanos de investigación. [actualizado 16 abril 2003; citado 02 Julio 2014]. Disponible en URL: [http://www.conbioeticamexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/normatividad/normatinternacional/10.\\_INTL\\_Informe\\_Belmont.pdf](http://www.conbioeticamexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/normatividad/normatinternacional/10._INTL_Informe_Belmont.pdf).
104. Universidad el Rosario [Internet]. Bogotá: Universidad el Rosario. Resolución 8430 de 1993 Ministerio de Salud, República de Colombia. [citado 02 Julio 2014]. Disponible en URL: [http://www.urosario.edu.co/urosario\\_files/a2/a24fb07a-f561-4fcc-b611-af4374bb7.pdf](http://www.urosario.edu.co/urosario_files/a2/a24fb07a-f561-4fcc-b611-af4374bb7.pdf).
105. Blalock Eric. A Beginner's Guide to Microarrays. Primera edición: Kluwer Academic Publishers. USA; 2003.

106. Jorstad T, Langaas M, et al. Understanding sample size: what determines the required number of microarrays for an experiment?. *Trends in plant science*. 2007; 12 (2): 46-50
107. Pan W, Lin J, Le CT. How many replicates of arrays are required to detect gene expression changes in microarray experiments? A mixture model approach. *Genome Biol* [Internet]. 2002;3(5):research0022.
108. Yaari-Stark S, Shaked M, Nevo-Caspi Y, Jacob-Hircsh J, Shamir R, Rechavi G, et al. Ras inhibits endoplasmic reticulum stress in human cancer cells with amplified Myc. *Int J Cancer*. 2010;126(10):2268-81.
109. Tanigawa S, Lee CH, Lin CS, Ku CC, Hasegawa H, Qin S, et al. Jun dimerization protein 2 is a critical component of the Nrf2/MafK complex regulating the response to ROS homeostasis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2013;4:e921.
110. Lo SC, Hannink M. PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37893-903.
111. Lo SC, Hannink M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Exp Cell Res*. 2008 May 1; 314(8): 1789–1803.
112. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods Elsevier Inc*. 2010;50(4):227-30.
113. Kuwada M, Chihara Y, Lou Y, Torimoto K, Kagebayashi Y, Tamura K, et al. Novel missense mutation in the FH gene in familial renal cell cancer patients lacking cutaneous leiomyomas. *BMC Res Notes* [Internet]. *BMC Research Notes*; 2014;7(1):203.
114. Vahteristo P, Koski T a, Näätsaari L, Kiuru M, Karhu A, Herva R, et al. No evidence for a genetic modifier for renal cell cancer risk in HLRCC syndrome. *Fam Cancer*. 2010;9(2):245-51.
115. Chang C-C, Kuo J-Y, Chan W-L, Chen K-K, Chang LS. Prevalence and clinical characteristics of simple renal cyst. *J Chin Med Assoc*. 2007;70(11):486-91.
116. Park H, Kim C. Natural 10-year history of simple renal cysts. *Korean J Urol*. 2015 May; 56(5): 351–356.
117. Skolarikos A, Laguna MP, De La Rosette JJMCH. Conservative and radiological management of simple renal cysts: A comprehensive review. *BJU Int*. 2012;110(2):170-8.
118. Lamba M, Verma S, Prokopetz R, Pierscianowski TA, Jabi M, Moyana T. Multiple cutaneous and uterine leiomyomas associated with gastric gist. *J Cutan Med Surg*. 2005;9(6):332-5.
119. Matyakhina L, Freedman RJ, Bourdeau I, Wei MH, Stergiopoulos SG, Chidakei A, et al. Hereditary leiomyomatosis associated with bilateral, massive, macronodular adrenocortical disease and atypical cushing syndrome: A clinical and molecular genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3773-9.
120. Carvajal-Carmona LG, Alam NA, Pollard PJ, Jones AM, Barclay E, Wortham N, et al. Adult Leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3071-5.
121. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, Tyrer JP, Calonje E, Manek S, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. *Arch Dermatol*. 2005;141(2):199-206.
122. Alrashdi I, Levine S, Paterson J, Saxena R, Patel SR, Depani S, et al. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma: Very early diagnosis of renal cancer in a paediatric patient. *Fam Cancer*. 2010;9(2):239-43.
123. Committee on bioethics, committee on genetics a, the american college of medical genetics and, genomics social, ethical, and legal issues committee. Ethical and Policy Issues in Genetic Testing and Screening of Children. *Pediatrics* 2013;131(3):620-2.
124. Zheng L, Mackenzie ED, Karim SA, Hedley A, Blyth K, Kalna G, et al. Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. *Cancer Metab*. 2013;1(1):12.
125. Chen Y-B, Branon R, Toubaji A, Dudas M, Won H, Al-Ahmadie H, et al. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome-associated Renal Cancer: Recognition of the Syndrome by Pathologic Features and the Utility of Detecting Aberrant Succination by Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2014 May; 38(5): 627–637
126. Buelow B, Cohen J, Nagymanyoki Z, Frizzel N, Joseph N, McCalmont T, et al. Immunohistochemistry for 2-Succinocysteine (2SC) and Fumarate Hydratase (FH) in Cutaneous

Leiomyomas May Aid in Identification of Patients With HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome). *Am J Surg Pathol* 2016;40:982–988.

127. Alsolami S, El-bahrawy M, Kalloger SE, Mulligan AM, Tomlinson IP, et al. Current Morphologic Criteria Perform Poorly in Identifying Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome-associated Uterine Leiomyomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2014 Nov;33(6):560-7.

128. Williams G, Stoeber K. The cell cycle and cancer cell. *J Pathol* 2012; 226: 352–364

129. Finn OJ. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(SUPPL.8):8-11.

130. Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5507-23.

131. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol Elsevier Ltd*. 2015;35:S224-43.

132. White E. the role for autophagy in cancer. *Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):42-6.

133. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev*. 2012;32(4):687-726.

134. Bhagya. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Top Med Chem*. 2005;12(10):1161-208.

135. Bajak E, Fabbri M, Ponti J, Gioria S, Ojea-Jiménez I, Collotta A, et al. Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles. *Toxicol Lett Elsevier Ireland Ltd*. 2015;233(2):187-99.

136. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):201.

137. Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, Raes M. HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life*. 2001;52(1-2):49-53.

138. Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer Nature Publishing Group*. 2010;10(1):65-76.

139. Chiou S-S, Wang SS-W, Wu D-C, Lin Y-C, Kao L-P, Kuo K-K, et al. Control of Oxidative Stress and Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-like Cells by Jun Dimerization Protein 2. *Cancers*. 2013;5(3):959-84.

140. Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H, Takeda K. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J Signal Transduct*. 2012: 1-12.

141. Xue M, Momiji H, Rabbani N, Barker G, Bretschneider T, Shmygol A, et al. Frequency Modulated Translocational Oscillations of Nrf2 Mediate the Antioxidant Response Element Cytoprotective Transcriptional Response. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(7):613-629.

142. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem*. 2002;48(8):1170-7.

143. Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact*. 2007;6(1):4.

## A. Anexo. Carta de aceptación de manuscrito por revista indexada.

Dear Dr. Arenas Valencia,

Thank you for submitting your manuscript, Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome: Identification and clinical characterization of a novel mutation in the FH gene in a Colombian family, to Familial Cancer.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://fame.edmgr.com/>

Your username is: carenasv

Your password is: available at this link [http://fame.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Carolina&lastname=Arenas+Valencia&email\\_address=carenasv@unal.edu.co](http://fame.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Carolina&lastname=Arenas+Valencia&email_address=carenasv@unal.edu.co)

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
Familial Cancer

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

**Familial Cancer**  
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager®  
Role: Author Username: carenasv

Submissions Being Processed for Author Carolina Arenas Valencia, M.D., Student of MSc in Human Genetics

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

| Action   | Manuscript Number | Title   | Initial Date Submitted | Status Date | Current Status |
|--|-------------------|---|------------------------|-------------|----------------|
| <a href="#">View Submission</a><br><a href="#">Correspondence</a><br><a href="#">Send E-mail</a> | FAME-D-15-00174   | Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome: Identification and clinical characterization of a novel mutation in the FH gene in a Colombian family | 10 Nov 2015            | 17 Nov 2015 | Under review   |

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Captura de pantalla de estatus del artículo

## B. Anexo. Consentimientos informados

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL.**  
**PROYECTO: Análisis de los perfiles de expresión diferencial de NRF2 en una familia colombiana con Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC**

Usted ha sido invitado a participar en el estudio de investigación: "**Análisis de los perfiles de expresión diferencial de NRF2 en una familia colombiana con Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC**" propuesto por la Maestría en Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia. En esta primera parte de la investigación nos interesa realizar una **Caracterización clínica y molecular de los pacientes.**

Estamos invitándolos a participar en este estudio por cuanto en su familia se han presentado casos de cáncer renal a edades tempranas y se ha hecho el diagnóstico de Síndrome de Leiomiomatosis y cáncer de células renales hereditario (HLRCC ). Esta condición se ha asociado con la presencia de una mutación en un gen denominado Fumarato Hidratasa (*FH*), la cual puede heredarse de una generación a la siguiente. El tener esta mutación implica un riesgo aumentado de padecer ciertas condiciones como lesiones benignas de piel, fibromas uterinos y en un porcentaje bajo de casos (10-16%) padecer de cáncer renal. Por lo anterior es importante conocer si se es portador de la mutación, para tomar algunas medidas tales como controles y exámenes médicos periódicos con el propósito de reconocer tempranamente estos problemas y poderlos tratar con mayor éxito. En caso de no encontrar la mutación en usted, no tendrá necesidad de tomar estas medidas y no tendrá ninguna probabilidad de transmitir la mutación a sus hijos.

Es muy importante que usted lea y entienda los siguientes puntos importantes en la realización del estudio molecular:

- (a) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) En este estudio se pretende conocer cuáles de los individuos participantes son portadores de la mutación causante de este síndrome.
- (c) Este es un estudio descriptivo en el que se tomará una muestra de sangre de una de las venas del antebrazo de 5ml aproximadamente (un tubo de tapa lila) y se elaborará una historia clínica de cada uno de los participantes. La toma de la muestra se llevará a cabo por parte de profesionales del área de la salud y será utilizada con el fin de detectar los cambios genéticos que causan este síndrome. Esta muestra será transportada al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en donde se hará el estudio del gen *FH*.
- (d) Si usted decide participar en este estudio, los riesgos a los que estará expuesto debido a las características de este estudio serán mínimos, como lo son el dolor asociado a la extracción de la muestra de sangre, la inflamación en el sitio de la toma de la muestra etc., sin embargo, estos estarán minimizados porque la muestra será tomada en condiciones completas de asepsia y por personal especializado.
- (e) Si tiene alguna duda con respecto a la naturaleza de este estudio, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- (f) Aunque usted no acepte participar en este estudio el grupo de investigadores puede ofrecerle las

explicaciones y asesoría que requiera y posteriormente ofrecerle, si usted lo solicita, la posibilidad del estudio genético.

(g) Este estudio le ofrece el beneficio inmediato de conocer su condición de portador o no de la mutación en el gen *FH* y por lo tanto conocer los riesgos sobre la salud que hemos señalado y el riesgo de que sus descendientes hereden la mutación y en consecuencia le permitirá tomar las medidas preventivas del caso y se podrá llevar a cabo un adecuado asesoramiento genético.

(h) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

(i) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted, puesto que hemos solicitado financiación por un programa de investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

(j) CONFIDENCIALIDAD: Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos y permanecerán archivados en el Instituto de Genética de la Universidad nacional. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Los resultados de este estudio podrían ser reportados en revistas médicas científicas o congresos científicos y en tal caso, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

(k) ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados del estudio le serán entregados (sin costo adicional) durante consulta clínica en presencia de un MEDICO GENETISTA. En caso que usted no acepte esta opción, el resultado será remitido en sobre cerrado directamente a usted o a su médico tratante.

(l) Si cualquier complicación se presenta durante la investigación, los investigadores lo ayudaran a obtener el tratamiento médico adecuado, pero este estudio no le suministrará ayuda financiera para gastos médicos y no médicos adicionales.

(m) Al firmar esta forma usted no está renunciando a sus derechos en caso de que se le cause algún daño personal.

(n) Este consentimiento está sujeto a revocarse cuando Usted así lo desee y manifieste. Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

**Dra. Clara Eugenia Arteaga**  
**cearteagad@unal.edu.co**  
**Instituto de Genética Universidad Nacional**  
**Tel . Conmutador: (57) (1) 316-5000 Extensión: 11631**

### Asentimiento informado

Es un documento de asentimiento informado para niños que han sido invitados a participar en la investigación: **Análisis de los perfiles de expresión diferencial de NRF2 en una familia colombiana con Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC**, que durante la primera parte que consistirá en una caracterización clínica y genética de los participantes.

*Los investigadores han realizado lo siguiente:*

Se ha preguntado al niño/a y entiende el propósito de este estudio

Se ha preguntado al niño/a y entiende que su participación es voluntaria

Se ha preguntado al niño/a y entiende que su información y los resultados son confidenciales

Se ha preguntado al niño/a y entiende los procedimientos que se realizarán

Se ha preguntado al niño/a y entiende los riesgos y molestias

Se ha preguntado al niño/a y entiende los beneficios

Yo \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años de edad, entiendo que se me ha invitado a participar en esta investigación porque en mi familia se han presentado casos de una enfermedad llamada Síndrome de Leiomiomatosis y cáncer de células renales hereditario (HLRCC) y se quiere conocer quienes están afectados por este Síndrome. Comprendo que tendré una cita con un médico donde se me examinará y luego se me tomará una muestra de sangre por punción en una vena en alguno de mis brazos. En todo momento mis padres estarán informados y me acompañarán durante todos los procedimientos. Los resultados se le comunicarán a mis padres y luego a mí cuando ellos lo consideren en la consulta de genética clínica de la Universidad Nacional.

Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. He leído esta información (o se me ha leído la información) y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo.

Acepto participar en la investigación.

Nombre del niño/a \_\_\_\_\_

Firma del niño/a: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Testigo \_\_\_\_\_

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTE O REPRESENTANTE LEGAL.**

**PROYECTO: Análisis de los perfiles de expresión diferencial de NRF2 en una familia colombiana con Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC**

*Usted ha sido invitado a participar en el estudio de investigación: “ Análisis de los perfiles de expresión diferencial de NRF2 en una familia colombiana con Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC” propuesto por la Maestría de Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia, En esta segunda parte de la investigación nos interesa Establecer los perfiles de expresión del factor NRF2 y las concentraciones de fumarato, en muestras de orina y sangre respectivamente; en los portadores de la mutación en FH, afectados con la mutación en FH y controles sanos.*

El objetivo de este documento, es que Usted conozca toda la información para que pueda tomar una decisión autónoma sobre su participación en esta investigación; si bien todo esto ya le ha sido explicado verbalmente, siéntase en libertad de preguntar y estaremos prestos a aclarar cualquier duda.

Por favor, lea con atención algunos aspectos relevantes sobre su participación en el estudio:

1. Recuerde que su participación es totalmente voluntaria y Usted puede retirarse en cualquier momento, sin que esto implique ningún perjuicio, inconveniente en la atención médica o afectación en la relación médico-paciente. Este consentimiento está sujeto a revocarse cuando Usted así lo desee y manifieste.
  2. Tenga en cuenta, que la participación en este proyecto no generará beneficios inmediatos sobre el paciente o sujeto de investigación, ni sobre su familia. No obstante, los aportes hechos por este trabajo permitirán aclarar varios conceptos sobre la fisiopatología, las vías metabólicas y redes genéticas en el Cáncer Renal Hereditario relacionado con el Síndrome HLRCC.
  3. Así mismo, ningún individuo involucrado en este trabajo recibirá beneficios económicos o de otro tipo como retribución por su participación. No existe de por medio ningún interés económico por parte de los investigadores y tampoco se desarrollaran patentes en base al material genético.
  4. Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted.
  5. CONFIDENCIALIDAD: Las Historias Clínicas y demás registros de los individuos del estudio permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional. Estos junto con los resultados de exámenes y en general toda la información que Usted nos ha aportado son de carácter absolutamente confidencial. Únicamente los investigadores tendrán acceso a estos datos, los cuales no se divulgaran sin su consentimiento.
- En el momento en que se obtengan los resultados del presente proyecto y se requiera reportarlos en congresos, seminarios o revistas médicas; todos los nombres de los participantes serán omitidos.
6. ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados del estudio serán entregados a Usted (sin ningún costo) durante la consulta Médica de Genética.
  7. Ante cualquier complicación que se presente durante el proyecto, los investigadores lo ayudaran a obtener tratamiento médico adecuado, pero no le suministrará ayuda financiera para gastos médicos y no médicos adicionales.
  8. Al firmar esta forma Usted no está renunciando a sus derechos en caso de que se le cause algún daño personal.

La naturaleza de este estudio, sus inconvenientes, sus riesgos se encuentran resumidas a continuación:

**Resumen del Proyecto de Investigación**

La leiomiomatosis uterina y el cáncer renal hereditario (HLRCC), constituye un Síndrome causado por



mutaciones en el gen *FH*, es de herencia autosómica dominante. A nivel mundial 270.000 pacientes se diagnostican con cáncer renal cada año y de estos aproximadamente 115.000 mueren en los primeros 5 años. Puede ser esporádico o hereditario, y este último comprende el 3-5% de todos los carcinomas renales en Colombia.

En cuanto al objetivo general, se buscara caracterizar los perfiles de expresión de la vía *NRF2* en controles sanos no relacionados, un paciente con cáncer renal hereditario y portadores de mutación en línea germinal de *FH*, pertenecientes estos dos últimos a una misma familia con HLRCC.

**PROCEDIMIENTO:** Se realizará una consulta clínica y los siguientes procedimientos:

Se tomará una muestra de aproximadamente 8 ml de sangre mediante punción en vena periférica y una muestra de orina matutina. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, Se le notificara oportunamente para tomar las muestras nuevamente.

Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por los miembros del equipo investigador en este proyecto y almacenadas en el Instituto de Genética Humana de Universidad Nacional de Colombia.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** Su participación en este estudio supone un riesgo mínimo para su salud e integridad. De presentarse molestias y/o efectos adverso, serán secundarios únicamente a la toma de muestra de sangre; la cual puede generar en algunos casos inflamación y la formación de un hematoma.

**BENEFICIOS ADICIONALES:** Los resultados del proyecto podrán ayudar a una mejor caracterización de los aspectos genéticos y vías metabólicas implicadas, en el cáncer renal hereditario asociado con el Síndrome HLRCC; especialmente en relación a lo concerniente con el factor de transcripción *NRF2*. Este conocimiento resultara relevante para futuras investigaciones, a la hora de encontrar nuevos blancos terapéuticos que permitan un mejor tratamiento de esta enfermedad.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

**Dra. Clara Eugenia Arteaga**

cearteagad@unal.edu.co

Instituto de Genética Universidad Nacional

Tel . Conmutador: (57) (1) 316-5000 Extensión: 11631

## C. Anexo. Formato de Historia Clínica

Nombre completo:

Identificación:

Historia Clínica No:

Fecha de nacimiento:

Edad:

En compañía de su acudiente:

Datos de contacto

✓ Teléfonos:

✓ Correo electrónico:

✓ Dirección de residencia y correspondencia:

Lugar de nacimiento:

Procedencia:

### Cuestionario de Síntomas HLRCC (Síndrome de leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditario)

#### Leiomiomas cutáneos

SI

NO

Edad de inicio      Numero aproximado      Localización      Color

Síntomas asociados

SI

NO

✓ Dolor      Parestesias      Prurito      Otro

Han aumentado de tamaño desde el inicio

SI

NO

Han aumentado en numero desde el inicio

SI

NO

Valoración por dermatología

SI

NO

Ha recibido tratamiento

SI

NO

Cual:

Estudio de histopatología (Institución)

SI

NO

Otras lesiones cutáneas

#### Leiomiomas uterinos

*Datos ginecológicos* Menarquia:

Ciclos:

FUR:

Planificación:

G

P

A

C

M

O

V

**Sangrados menstruales abundantes**    SI            NO

**Dolor pélvico**    SI            NO

**Edad de inicio de síntomas:**

**Miomas uterinos**    SI            NO

**Reporte de Ecografía Transvaginal o abdominal**    SI            NO

**Estudio histopatológico (Institución)**            SI    NO  
**Ha recibido tratamiento**    SI    NO

**Quirúrgico:**                      **Edad:**

**Medico:**                      **Edad:**

**Cáncer renal**

**Hematuria**            SI    NO

**Dolor de espalda**    SI    NO

**Masa abdominal**    SI    NO

**Quistes renales**        SI    NO

**Edad de diagnostico:**

**Reporte de ecografía abdominal o de vías urinarias**    SI    NO

**Reporte de RMN renal o abdominal:**    SI    NO

**Estudio histopatológico (Institución)**            SI    NO

**Tratamiento quirúrgico (Institución):**    SI    NO

**Tumores renales**        SI    NO

**Edad de diagnostico:**

**Reporte de ecografía abdominal o de vías urinarias**    SI    NO

**Reporte de RMN renal o abdominal:**    SI    NO

**Estudio histopatológico (Institución):**    SI    NO                      **Papilar tipo 2**    SI    NO

**Tratamiento quirúrgico (Institución) :**    SI            NO

**Tratamiento medico (quimio o radioterapia)**    SI    NO

**Metástasis**            SI    NO

**Revisión por sistemas**

### Antecedentes personales

### Antecedentes familiares

**Familia paterna natural de:**

**Familia materna natural de:**

**Consanguinidad de los padres** SI NO

**Familiares en primer grado con:**

|   |   |            |            |      |    |
|---|---|------------|------------|------|----|
| ✓ | Leiomiomas cutáneos                                       | SI         | Parentesco |      | NO |
| ✓ | Leiomiomas uterinos                                       | SI         | Parentesco |      | NO |
| ✓ | Cáncer renal  | SI         | Parentesco | Tipo | NO |
| ✓ | Diagnostico de HLRCC                                      | SI         | Parentesco |      | NO |
| ✓ | Diagnostico molecular de mutaciones en <i>FH</i> positivo |            |            |      |    |
|   | SI  | Parentesco |            |      | NO |

**Otros familiares con**

|   |   |            |            |  |    |
|---|---|------------|------------|--|----|
| ✓ | Diagnostico de HLRCC                                      | SI         | Parentesco |  | NO |
| ✓ | Diagnostico molecular de mutaciones en <i>FH</i> positivo |            |            |  |    |
|   | SI  | Parentesco |            |  | NO |

**Otros antecedentes familiares positivos:**

### Árbol Genealógico



### Examen físico

FC FR TA PESO TALLA

**General:**

**Lesiones cutáneas** SI NO

**Diámetro: Coloración: Ubicación: Descripción: Se toma fotografía** SI NO

### Reporte otros paraclínicos

### Estudio molecular mutación en línea germinal *FH*

**Historia clínica realizada por la co-investigadora:**

**Dra. Clara Eugenia Arteaga Díaz**

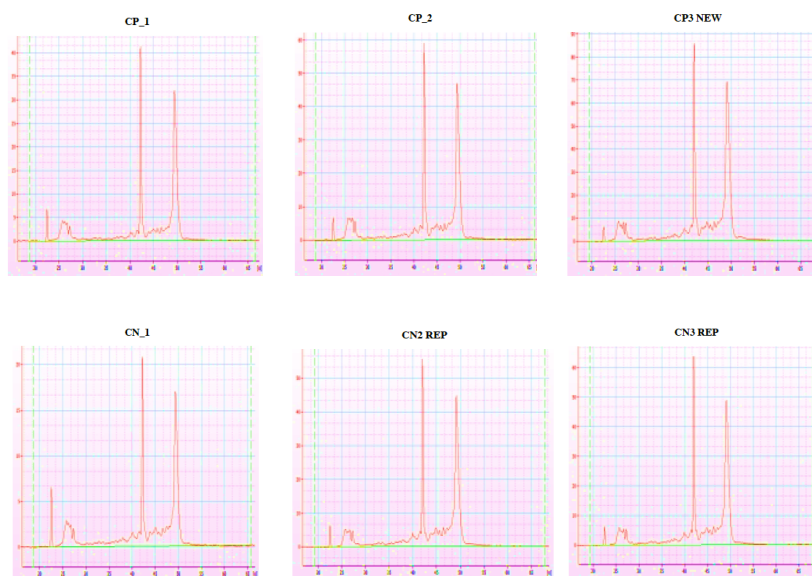
**Medico Genetista, Magister en Bioética.**

**Docente Maestría Genética Humana de la Universidad Nacional.**

#### **D. Anexo. Datos de conteo y viabilidad celular PBMCs - especificaciones de las muestras de RNA.**

| Código de la muestra | Conteo celular                       | Viabilidad celular | Concentración (ng/ul) | Pureza (A260/280) | Pureza (A260/230) | Volumen (ul) | rRNA radio | RIN | Resultado final del QC (quality check) |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------|------------|-----|--|
| CP1                  | 1 x 10 <sup>6</sup><br>(1.000.000)   | >80%               | 180                   | 1.99              | 1.0               | 15           | 1.7        | 9   | Paso                                   |
| CP2                  | 1.9 x 10 <sup>6</sup><br>(1.900.000) | >80%               | 282                   | 2                 | 1.0               | 15           | 1.6        | 9   | Paso                                   |
| CP3-NEW              | 4 x 10 <sup>6</sup><br>(4.000.000)   | 80%                | 424.55                | 1.94              | 2.03              | 7            | 1.6        | 9   | Paso                                   |
| CN1                  | 3.4 x 10 <sup>6</sup><br>(3.400.000) | >80%               | 110                   | 1.98              | 1.0               | 15           | 1.6        | 8.5 | Paso                                   |
| CN2-REP              | 5 x 10 <sup>6</sup><br>(5.000.000)   | 80%                | 278.6                 | 1.98              | 1.0               | 7            | 2.1        | 8.8 | Paso                                   |
| CN3-REP              | 4 x 10 <sup>6</sup><br>(4.000.000)   | 80%                | 304.67                | 1.95              | 1.32              | 7            | 1.5        | 8.8 | Paso                                   |

La pureza y concentración fue medida mediante NanoDrop; el radio de la absorbancia a 260, en cuanto a la absorbancia de 280 y 230, es un indicador de pureza y valores que oscilaran entre 1.7 y 2.0, fueron considerados como indicadores de pureza. La calidad se determinó calculando el Numero de Integridad del RNA (RIN por sus siglas en inglés), con el equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies. Un RIN mayor o igual a 8, se interpreto como indicador de calidad.



Imágenes obtenidas luego de análisis en equipo Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies)

### ***E. Anexo. Grafica de normalización de los microarreglos***

